FÖTALE MÄUSELEBERZELLKULTUREN ALS TESTSYSTEM FÜR STIMULIERENDE UND HEMMENDE FAKTOREN DER ERYTHROPOESE

Ein Beitrag zur weiteren Charakterisierung
der renalen Anämie im Kindesalter

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der
Medizinischen Fakultät des Wissenschaftlichen Rates
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Med. Christine Gronke
geb. am 28.08.1956 in Bad Saarow-Pieskow

Dekan: Prof.Dr.sc.med. H. David

Gutachter: 1. Prof. Dr. sc. med. Großmann
2. MR Prof. Dr. sc. med. Stobbe
3. Prof. Dr. rer. nat. habil. Langen

Berlin, den 20.9.1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548910_0006

Es ist mir ein Bedürfnis, meinen akademischen Lehrern für die mir bei der Anfertigung der Arbeit erwiesene Beratung und Hilfe von Herzen zu danken.
Dies gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. sc. med. P. Großmann, Direktor der Kinderklinik des Bereiches Medizin (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin, und Herrn Prof. Dr. habil. P. Langen, Leiter der Abteilung Zellkinetik am Zentralinstitut für Molekularbiologie der Akademie der Wissenschaften der DDR, die mich in der Zielstellung der Arbeit und bei der Durchführung der Experimente großzügig unterstützten.
Mein besonderer Dank gebührt Herrn Dr. M. Schütt, Abteilung Zellkinetik am Zentralinstitut für Molekularbiologie der Akademie der Wissenschaften der DDR, für die ständige wertvolle Zusammenarbeit und ausführliche sachkundige Beratung.
Große Hilfe habe ich auch von Herrn Doz. Dr. sc. med. S. Devaux, Leiter der Dialyseabteilung der Kinderklinik der Charité, Herrn Prof. Dr. habil. H. Stobbe, Leiter der Hämatologischen Abteilung der Klinik für Innere Medizin der Charité, Frau Dr. Elstner und dem Kollektiv der Hämatologischen Abteilung erhalten.
Ich danke ebenfalls Frau Dr. E. Wahner, die mir bei der Beschaffung des anämischen Mäuseplasmas aus der UdSSR behilflich war, wie auch Herrn Dipl.-Math. D. Hellmich vom Rechenzentrum am Zentralinstitut für Molekularbiologie der Akademie der Wissenschaften der DDR für die Aufstellung eines Computer-Programms für Parallellinien-Bioassays und die Durchführung der Rechnungen.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Problemstellung und Ziel der Arbeit	1
2.	Theoretische Grundlagen	5
2.1.	Aufbau und Regulation des erythropoetischen Systems	5
2.2.	Stimulatoren der Erythropoese	8
2.2.1.	Burst promoting activity	8
2.2.2.	Erythropoietin	8
2.2.3.	Weitere die Erythropoese stimulierende Faktoren	10
2.3.	Inhibitoren der Erythropoese	11
2.3.1.	Erythropoiesis inhibiting factor	11
2.3.2.	„Urämietoxine"	12
3.	Material und Methoden	18
3.1.	Vorbereitungen für die Kultivierung fötaler Mäuseleberzellen	18
3.1.1.	Reinigen und Sterilisieren von Geräten und Instrumenten	18
3.1.2.	Präparation des Zellzuchtmediums, der Testplasmen sowie des Erythropoietin-Standards	19
3.1.3.	Herstellung der fötalen Mäuseleberzell-Suspension	20
3.2.	Durchführung der fötalen Mäuseleberzell-Kultivierung	22
3.3.	Weitere Methoden	25
3.4.	Patienten und Probanden	25
3.5.	Statistische Auswertung	29

		Seite
4.	Ergebnisse	30
4.1.	Charakterisierung und Standardisierung der Methode	30
4.1.1.	Morphologische Charakterisierung fötaler Mäuseleberzellen	30
4.1.2.	Spontanes Proliferationsverhalten fötaler Mäuseleberzellen	31
4.1.3.	Stimulierung der DNS-Synthese fötaler Mäuseleberzellen durch Erythropoietin	33
4.1.4.	Stimulierung der DNS-Synthese fötaler Mäuseleberzellen durch anämisches Mäuseplasma	43
4.1.5.	Versuche zur Optimierung der Methode	45
4.2.	Anwendung der Methode	51
4.2.1.	Bestimmung der Erythropoese-stimulierenden Aktivität (ESA) menschlicher Plasmen	51
4.2.2.	Die fötale Mäuseleberzell-Kultur als in vitro-Testmodell für „Urämietoxine"	60
5.	Diskussion	66
6.	Zusammenfassung	88
7.	Literaturverzeichnis	92
8.	Anhang	
9.	Thesen	

Abkürzungsverzeichnis

AA	Aplastische Anämie
BFU-E	"burst forming unit-erythroid", erythroide multizentrische Kolonien bildende Einheit, erythroide Vorläuferzelle
BPA	"burst promoting activity", die Bildung multizentrischer erythroider Kolonien stimulierende Aktivität
CFU-E	"colony forming unit - erythroid" erythroide Kolonien bildende Einheit erythroide Vorläuferzelle
dpm	"disintegrations per minute" Zerfälle pro Minute
DNS	Desoxyribonucleinsäure
E	Einheit
EEF	"erythroblast enhancing factor" ein primar auf die Erythroblasten wirkender stimulierender Faktor
EIF	"erythropoiesis inhibiting factor" Erythropoese-hemmender Faktor
EPO	Erythropoietin
ESA	Erythropoese-stimulierende Aktivität
FKS	fötales Kälberserum
FMLZ	fötale Mäuseleberzellen
^{3}H-TdR	^{3}H-Thymidin

^{125}J-UdR	^{125}J-2'-Desoxyuridin
MP	anämisches Mäuseplasma
n.D.	nach Dialyse
NP	Normalplasma, menschliches
PV	Polyzythämia vera
PZM	Polyzythämische Maus
RIA	Radioimmunassay
RNS	Ribonucleinsäure
s	Standardabweichung
U/min	Umdrehungen pro Minute
UP	urämisches Plasma, menschliches
v	Variabilitätskoeffizient
v.D.	vor Dialyse
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert

1. Problemstellung und Ziel der Arbeit

Es ist bekannt, daß Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz (s. 2.3.2.) gleichzeitig immer an einer in der Regel normozytären und normochromen Anämie leiden.
Diese sogenannte „renale Anämie" stellt ein großes Problem vor allem für die Hämodialysepatienten und hier besonders für Kinder dar.

Mit der derzeitigen hoch entwickelten Dialysetechnik können niereninsuffiziente Kinder überleben und auf eine Nierentransplantation vorbereitet werden.
Begrenzend jedoch sowohl für das Wohlbefinden der Kinder, ihre Leistungsfähigkeit und damit auch soziale Rehabilitation als auch für ihre Dialyse- und Transplantationsfähigkeit ist das Ausmaß der bestehenden Anämie. Sie kann bisher nur ungenügend beeinflußt werden und macht vor allem bei Kindern immer wieder Transfusionen notwendig.
Letztere sind mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Hepatitis, der Entwicklung einer Hämosiderose oder einer Sensibilisierung verbunden, welche die Prognose für eine erfolgreiche Nierentransplantation verschlechtern.

Darüber hinaus hat die Anämie einen negativen Einfluß auf das durch die urämische Stoffwechsellage und Überwässerung ohnehin geschädigte Herz-Kreislauf-System.
Myokardschäden und Herzinsuffizienz zählen zu den Hauptursachen für die Mortalität der Hämodialysekinder (SCHÄRER et al., 1974).

Um die Anämie der Hämodialysekinder therapeutisch beeinflussen zu können, ist es notwendig, deren Ursachen zu ergründen.
Eine Reihe von Untersuchern rückt daher die renale Anämie in den Mittelpunkt ihrer Forschungen (BRUNNER et al., 1976, 1978, 1979; CHANDRA et al., 1983; EGGERT, 1982; HELLWEGE et al., 1978; KOCH et al., 1979; MÜLLER-WIEFEL, 1981 a, b, 1982; OHNO et al., 1977, 1978; RADTKE et al., 1977, 1978 a, b, 1979; SCIGALLA et al., 1980 a, b, 1981).

RADTKE et al. (1979) fanden eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Anämie (gemessen am Hämatokritwert) und dem der Nierenfunktionseinschränkung (gemessen an der endogenen Kreatininclearance).
Dieser Zusammenhang resultiert aus der zentralen Rolle der Niere in der Regulation der Erythropoese (s. 2.2.).

Die Pathogenese der renalen Anämie ist jedoch nicht auf der Grundlage eines Faktors allein, sondern als ein multifaktorielles Geschehen zu erklären.
Es werden heute vorrangig vier Faktoren diskutiert.

Eine Ursache sind ständige kleinere Blutverluste der urämischen Patienten (Schleimhautblutungen bei Thrombozytenfunktionsstörung, urämische Gastritis u.a.), möglicherweise verbunden mit einem Eisenmangel (durch häufige Transfusionen liegt bei den Hämodialyse-Patienten oft eher eine Eisenüberladung vor). Patienten im chronischen Hämodialyseprogramm erleiden zudem ständige nicht vermeidbare Blutverluste durch den extrakorporalen Blutkreislauf, durch Blutungen auf Grund der Heparinisierung und durch regelmäßige diagnostische Blutabnahmen.

Als eine zweite Ursache für die Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz wird eine verstärkte Hämolyse im urämischen Milieu diskutiert.

Die Erythrozytenhalbwertzeit ist unter den Bedingungen der chronischen Niereninsuffizienz gegenüber der Norm um 40 - 50 % verkürzt (EGGERT, 1982). Die Ursachen für die verstärkte Hämolyse bei renaler Anämie sind noch nicht restlos geklärt. Nach EGGERT (1982) haben möglicherweise folgende Mechanismen für die vorzeitige Eliminierung roter Blutzellen entscheidende Bedeutung: „... eine intrazelluläre Störung, die sich in einer vermehrten oxydativen Schädigung des Hämoglobins und einer erhöhten Lipidperoxydation alter Zellen äußert; der verstärkte Aktivitätsverlust von Enzymen wie der G6PD mit Auswirkungen auf die Bereitstellung von $NADPH_2$ und damit Einfluß auf den Glutathionstoffwechsel; eine verminderte Verformbarkeit, verbunden mit einer verlangsamten Passage in der Mikrozirkulation und nachfolgenden reduzierten Stoffwechselleistungen der Zelle." In Kreuzversuchen zeigt er, daß in erster Linie extrakorpuskuläre Faktoren in Form des urämischen Plasmas, insbesondere niedermolekulare Substanzen (Molekularmasse bis zu 500 Dalton) für die beobachteten Veränderungen roter Blutzellen verantwortlich sind.

Normalerweise werden Blutverluste und verstärkte Hämolyse durch Aktivierung der Erythropoese kompensiert, nicht jedoch bei niereninsuffizienten Patienten.

Als dritte - von vielen Autoren als primäre - Ursache der renalen Anämie wird daher ein Mangel des Hormons Erythropoietin (EPO) diskutiert (KOCH et al., 1979; Mc GONIGLE, 1984 b; MÜLLER-WIEFEL, 1981 a, b, 1982; RADTKE et al., 1978 a, b, 1979), welches seinen Hauptproduktionsort in der Niere hat. Man nimmt an, daß bei der Zerstörung des Nierenparenchyms die exkretorische Funktionseinschränkung mit einer inkretorischen parallel verläuft.

Gestützt wird diese Theorie dadurch, daß bei den meisten Anämien anderer Genese sehr hohe Erythropoietin-Spiegel nachweisbar sind.

Eine vierte Ursache, die in den letzten Jahren zunehmend diskutiert wird, ist der hemmende Einfluß sogenannter „Urämietoxine" auf die Erythropoese. (BRUNNER et al., 1976, 1978, 1979; HELLWEGE et al., 1978; Mc GONIGLE et al., 1984 b; OHNO et al., 1977, 1978; SCIGALLA et al., 1980 a, b, 1981; WALLNER et al., 1975, 1976). Dabei ist unklar, auf welcher Stufe der Erythrozytenbildung die Hemmung stattfindet, ob es sich um eine Hemmung der EPO-Bildung, um eine spezifische Inhibition der EPO-Wirkung, eine Proliferations- und Differenzierungsstörung erythroider Vorläuferzellen, eine Hämoglobinsynthesestörung oder auch um eine unspezifische Proliferationshemmung handelt. Weitgehend unbekannt sind auch die chemische Struktur und der Ursprung jener Toxine. In den letzten Jahren wurde vor allem der hemmende Einfluß sogenannter schwer dialysabler „Mittelmoleküle" (s. 2.3.2.) diskutiert. (ASABA et al., 1983 a, b; LEBER et al., 1978; BRUNNER et al., 1978, 1979; BERGSTRÖM et al., 1979; NAVARRO et al., 1979, 1982; SCIGALLA et al., 1980 a, b, 1981).
Vermutet wird die Urämie-bedingte Anhäufung physiologischer die Erythropoese hemmender Faktoren wie auch toxischer Metabolite, die im Normalserum nicht vorhanden sind (s. 2.3.2.).

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, einen Beitrag zur weiteren Charakterisierung und Erforschung der Ursachen der renalen Anämie im Kindesalter zu leisten.
Im Rahmen dieser Problematik wurde ein sensibles und zuverlässiges Testsystem zur Bestimmung der Erythropoese-stimulierenden Aktivität (ESA) in Plasmen urämischer Patienten sowie zum Nachweis der Hemmwirkung von urämischem Plasma auf die Erythropoese eingearbeitet.

Als Grundlage für die Untersuchungen bot sich eine aus der Literatur bekannte Methode zur Kurzzeitkultivierung von fötalen Mäuseleberzellen (FMLZ) an.
Die anwendungsbereite Einführung dieser FMLZ-Methode (Versuche zur Standardisierung und Erprobung der Methode nehmen daher einen breiten Raum in der Arbeit ein) soll Ausgangspunkt für weitere Forschungen sein.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Aufbau und Regulation des erythropoetischen Systems

Die rote Blutzelle als eine hochspezialisierte Zelle des menschlichen Organismus durchläuft während ihrer Differenzierung und Reifung verschiedene Entwicklungsstadien, die im einzelnen den Kompartments zuzuordnen sind, in die das immunohämatopoetische System strukturiert ist (s. Abb. 1).

Am Beginn stehen die undifferenzierten pluripotenten Stammzellen. Sie bilden das Stammzellkompartment. Die pluripotente Stammzelle ist charakterisiert durch ihre Fähigkeit zur Selbsterhaltung und durch ihre Omnipotenz. Sie ist die gemeinsame Vorläuferzelle der lymphatischen, myeloischen, megakaryozytären und erythrozytären Reihe. Man vermutet, daß sich unter dem Einfluß von Hämopoietinen und einem bestimmten hämopoetischen Mikromilieu aus den pluripotenten Stammzellen die determinierten Vorläuferzellen differenzieren. Der genaue Mechanismus dieser Determinierung ist bisher unklar. Der Stammzellcharakter geht mit zunehmender Differenzierung verloren.
Die erste nachweisbare Zelle der erythroiden Reihe ist die „burst forming unit-erythroid" (BFU-E). Ihr Wachstum wird vor allem durch die sogenannte „burst promoting activity" (s. 2.2.1.) kontrolliert. Ihr folgt als etwas

differenziertere erythroide Vorläuferzelle die „colony forming unit-erythroid" (CFU-E), deren Proliferation und weitere Differenzierung zum Erythroblasten von Erythropoietin abhängig ist. BFU-E und CFU-E bilden die morphologisch noch nicht charakterisierten erythropoetisch determinierten Vorläuferzellen (Vorläuferkompartment), die auf Grund ihres Proliferationsvermögens in vitro zur Koloniebildung fähig sind und auf diese Weise funktionell charakterisiert und quantitativ bestimmt werden können.

Ein drittes Kompartment umfaßt dann die morphologisch erkennbaren erythroiden Zellen (Proerythroblasten, Makroblasten, Erythroblasten und Retikulozyten). Am Ende steht der reife, hoch spezialisierte, zirkulierende Erythrozyt (Kompartment der terminal differenzierten Endzellen).

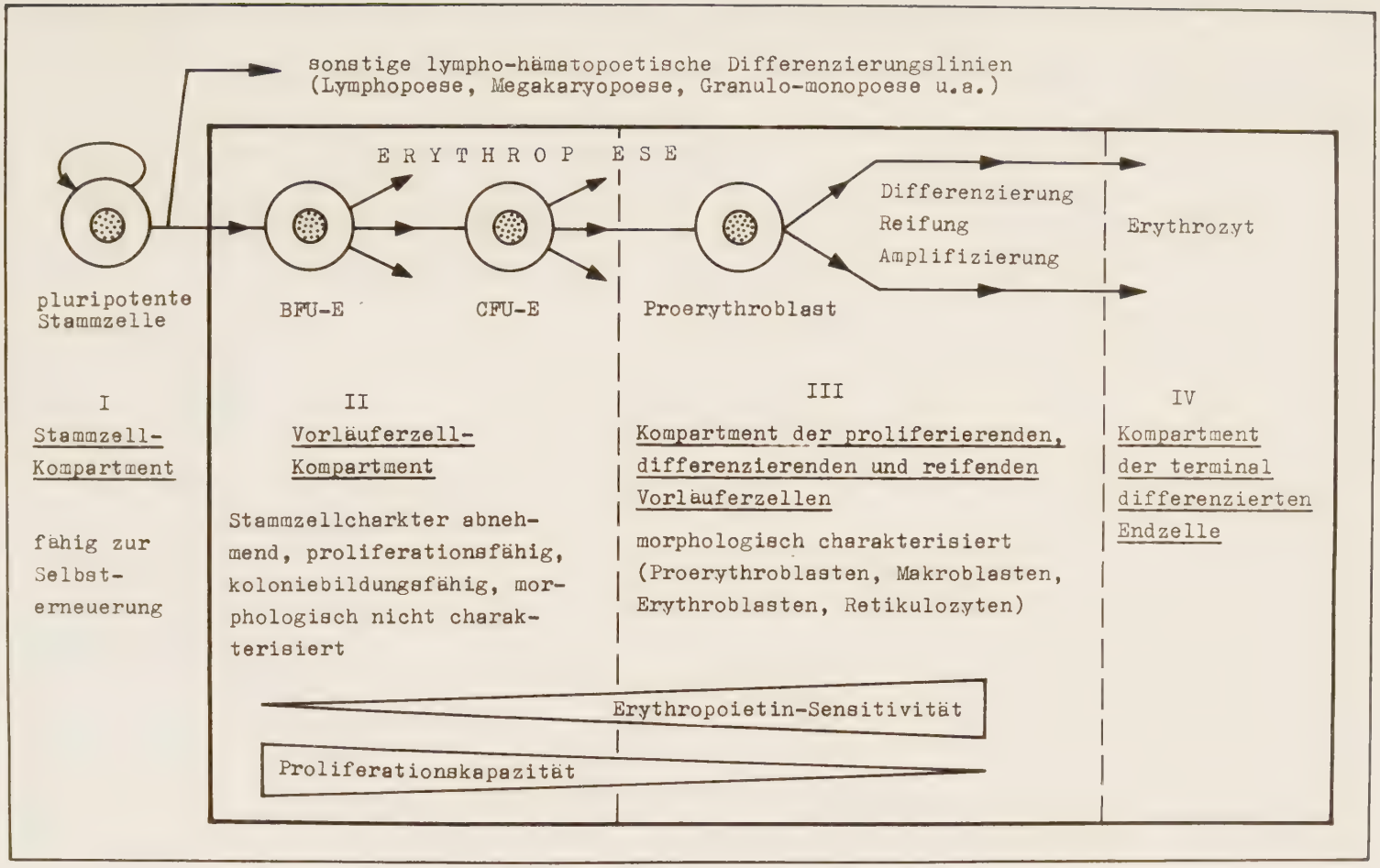

Abb. 1: Die Erythropoese als Teil des immunohämatopoetischen Systems

2.2. Stimulatoren der Erythropoese

2.2.1. Burst promoting activity

Verschiedene Untersucher wiesen darauf hin, daß im Serum eine von Erythropoietin verschiedene Aktivität vorhanden ist, die die frühesten proliferativen Schritte der Erythropoese stimuliert. So erhöhen z.B. Anämie und Hypoxie die EPO-Spiegel, beeinflussen aber nicht die Zahl der BFU-E. Demgegenüber wird die Koloniebildung aber durch Granulozyten-, Nieren- oder T-Lymphozyten-konditionierte Medien stimuliert.
Die aktive Komponente in solchen Präparationen wurde „burst promoting activity" (BPA) genannt, weil sie eine spezifische Art erythroider Vorläuferzellen, die BFU-E, zur Koloniebildung anregt, die durch die Bildung typischer multizentrischer Kolonien („bursts", Schollen) von der vorher bekannten „erythroiden Stammzelle" CFU-E (s. auch 2.1.) unterschieden werden kann.
BPA agiert als Hauptregulator der frühen, EPO-unabhängigen Proliferation der Zellen der erythroiden Reihe (ELIASON et al., 1982; METCALF 1981; PORTER et al., 1980).

2.2.2. Erythropoietin

Es ist unumstritten, daß das Hormon Erythropoietin (EPO) als Hauptregulator der Erythropoese fungiert.
Der Hauptbildungsort für EPO bzw. eine noch nicht aktivierte Vorstufe ist die Niere, in der die Glomeruli als Produktionsort nachgewiesen wurden (FISCHER et al., 1971; JELKMANN et al., 1983).

Wie durch den Nachweis an binephrektomierten Tieren belegt werden konnte (FRIED, 1972), wird EPO aber auch extrarenal synthetisiert. Ein zusätzlicher Bildungsort ist die Leber, die bereits in der Neonatalperiode EPO bildet (FRIED, 1972; GRUBER et al., 1977; MEYRIER et al., 1981).

Den physiologischen Stimulus für die EPO-Produktion bildet die Gewebshypoxie der Niere.
Der genaue Mechanismus der EPO-Aktivierung ist noch ungeklärt. Es wird diskutiert, daß in der Niere („Proerythropoietin") oder Leber („Erythropoietinogen") gebildete Vorstufen im Serum durch Faktoren („Erythrogenin") aktiviert werden, die ihrerseits wiederum aus Leber oder Niere stammen (KURATOVSKA et al., 1961; ERSLEV, 1974). Wahrscheinlich ist, daß die Glomeruli EPO in einer inkompletten Vorläufer-Form synthetisieren (Mesangiumzellen) (JELKMANN et al., 1983).

Das EPO wirkt selektiv auf das hämatopoetische System, indem es spezifisch die Erythropoese stimuliert und keine Effekte auf die Granulo-, Lympho- und Megakaryopoese ausübt (GRABER et al., 1978).
EPO besitzt keinen Einfluß auf die pluripotenten Stammzellen, sondern stimuliert spezifisch die determinierten Vorläuferzellen der Erythropoese (CFU-E, BFU-E) und deren differenzierenden Nachkommen, wobei sowohl die Proliferation (DNS-Synthese) als auch die Differenzierung (Hämoglobinsynthese) angeregt werden (GOLDWASSER, 1981; HEIDEMANN, 1980; HEILMANN, 1980; NEUWIRT, 1981).
Dabei nimmt die Abhängigkeit der erythroiden Zellen von EPO mit steigender Differenzierung zu. Gleichzeitig steigt die Empfindlichkeit gegenüber EPO, was erklärt wird mit einem Ansteigen der EPO-Rezeptoren auf der Membran der verschiedenen erythroiden Vorläuferzellen (PESCHLE, 1980; LAFFERTY et al., 1980).

In vivo und in vitro Untersuchungen belegen, daß die letzten Stufen der erythroiden Reifung von EPO unabhängig sind, denn auf Normoblasten, Retikulozyten und Erythrozyten übt EPO keinen Effekt aus (GRABER et al., 1978; GOLDWASSER, 1981 b).

EPO ist ein Glykoprotein. Trotz intensiver Bemühungen um die Aufklärung der Molekularstruktur ist es bisher nicht gelungen, die vollständige Sequenz aufzuklären (GOLDWASSER, 1981; YANAGAWA et al., 1984).
Auch die Angaben über das Molekulargewicht (zwischen 27 000 und 61 800 Dalton) schwanken in weiten Bereichen (GRABER et al., 1978; GOLDWASSER 1975 b, 1981 a, b; LEE-HUANG, 1984; YANAGAWA et al., 1984).

Der Metabolismus des EPO ist noch weitgehend ungeklärt. Während einige Untersucher die Leber für das Organ halten, in dem das EPO abgebaut wird, schreiben andere der Niere diese Rolle zu (DINKELAAR et al., 1981).

Die weitere Aufklärung des Stoffwechsels und der Wirkungsweise von EPO wie auch die Erprobung der eventuellen therapeutischen Brauchbarkeit (Anämietherapie) hängt von der Verfügbarkeit ausreichender Mengen reiner Substanz ab, die künftig mit Hilfe monoklonaler Antikörper durch Immunaffinitätschromatographie (YANAGAWA et al., 1984) oder mit Hilfe gentechnischer Methoden (LEE-HUANG, 1984) bereitgestellt werden können.

2.2.3. Weitere die Erythropoese stimulierende Faktoren

Das erythropoetische System reagiert mit seinen spezifischen Leistungen (Hämoglobinsynthese und Erythrozytenproduktion) überaus empfindlich auf die Anforderungen des Organismus.

Dieses Vermögen wird - wie in allen komplexen Geweben und Organen - durch das Zusammenspiel mehrerer sowohl stimulierender als auch hemmender (s. 2.3.) Faktoren erreicht. Neben EPO und BPA wirkt daher eine Reihe weiterer stimulierender Faktoren auf die Erythropoese modifizierend ein, deren spezifische Funktionen in vivo häufig noch nicht erkannt sind.
So konnte KRYSTAL (1983) einen von EPO verschiedenen sogenannten „erythroblast enhancing factor" (EEF) aus normalem menschlichen Serum und Mäuseserum isolieren (MG 130 000 Dalton), der primär stimulierend auf die Erythroblasten wirkte. Seine Aktion war synergistisch mit EPO bei der Messung des ^{59}Fe-Einbaus in Knochenmarkkulturen.
Eine vergleichbare, von EPO verschiedene, stimulierende Aktivität beschrieben auch UDUPA und REISSMANN (1980).
Aus in vivo und in vitro Experimenten sind endokrine Beeinflussungen (Androgene, Östrogene, Schilddrüsenhormone, Parathormon, Kortikosteroide) der Erythropoese bekannt (BILLAT et al., 1982; FUHR et al., 1979; GIGLIO et al., 1981; HALVORSEN, 1974; LINDEMANN, 1973; PESCHLE, 1980; MASSRY, 1983).
Essentiell für die Regulation erythropoetischer Prozesse ist auch die Wechselwirkung mit T-Lymphozyten und deren Produkten, die besonders die frühen Stufen der Erythropoese beeinflussen (CLINE et al., 1979; MARCHAL et al., 1984).

2.3. Hemmstoffe der Erythropoese

2.3.1. Erythropoiesis inhibiting factor

Über das Vorhandensein physiologischer die Erythropoese hemmender Faktoren ist noch wenig bekannt (HALVORSEN, 1974; NEUMANN, 1980).

Man nimmt jedoch an, daß auch im erythropoetischen System die negative Feedback-Wirkung des Endproduktes auf die das Endprodukt erzeugende Reaktion zur Regulation beiträgt. Diese dem Chalonprinzip entsprechende Wirkung der Produkte reifer Zellen auf die Proliferation der unreifen Vorläuferzellen wird im hämatopoetischen System auch für die Granulo- und Lymphopoese diskutiert (IVERSEN, 1981).

So fanden LORD und LINDEMANN einen die Erythropoese hemmenden Faktor (EIF) in Hämolysaten roter Blutzellen von Kaninchen (LORD et al., 1974; LINDEMANN, 1975). Analog wiesen KIVILAAKSO und RYTÖMAA (1971) sowie NEUMANN (1980) im Überstand von mit isotoner Kochsalzlösung inkubierten Ratten- und Human-Erythrozyten einen EIF nach.
Es handelt sich um einen niedermolekularen Hemmfaktor mit einem Molekulargewicht 1 000 bis 5 000 Dalton.

Im Serum konnten EIF bei hypertransfundierten Schafen (KRZYMOWSKI und KRZYMOWSKA, 1962), polyzythämischen Ratten (KIVILAAKSO und RYTÖMAA, 1970) und bei polyzythämischen Kaninchen (MORIYAMA, 1974) nachgewiesen werden.
Auch im normalen menschlichen Serum sowie im Urin von Normalpersonen und Neugeborenen wurde EIF gefunden (LINDEMANN, 1971, 1974; NEUMANN, 1980).
Eine chemische Charakterisierung und Aufklärung des Wirkungsmechanismus des EIF sind noch nicht erfolgt, ebenso wie der Nachweis der Gewebespezifität der Wirkung, die für chalonartige Wirkstoffe charakteristisch ist.

2.3.2. „Urämietoxine"

Da die chronische Niereninsuffizienz dadurch charakterisiert ist, daß die Nieren nicht mehr in der Lage sind, ihre Aufgabe als Ausscheidungsorgan und Regelorgan des „inneren

Milieus" des Organismus zu erfüllen, kommt es im Organismus zu Veränderungen im Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt, Änderungen des extrazellulären Volumens, der Osmolarität und zur Retention und Akkumulation harnpflichtiger Substanzen, welche die Ursachen für eine allgemeine Zellstoffwechsel- und Organstörung in der Urämie darstellen. Diese toxisch wirkenden Substanzen im urämischen Plasma wurden von BERGSTRÖM und FÜRST als „Urämietoxine" bezeichnet (BERGSTRÖM und FÜRST, 1978).

Die Tabelle 1 enthält wichtige organische Substanzen, die im urämischen Serum in hoher Konzentration angereichert sind (EGGERT, 1981).

Dabei ist zu beachten, daß einige Stoffe wie z.B. das Parathormon primär natürlich keine Toxine darstellen, sondern erst durch die pathologische Akkumulation infolge der Ausscheidungsinsuffizienz toxisch wirken.

Ein Teil der Urämietoxine entsteht durch eine Anhäufung von Zwischenmetaboliten infolge der Störung spezifischer Stoffwechselwege in der Urämie, wie zum Beispiel die Anhäufung von Guanidinderivaten durch den Harnstoffzyklus (LEBER et al., 1978).

Denkbar ist, daß eine Reihe toxischer Symptome erst durch die kombinierte Wirkung verschiedener retinierter Stoffe entstehen (SCIGALLA, 1981).

Tabelle 1: Wichtige Substanzen, die bei Urämie im Plasma akkumuliert sind (EGGERT, 1981)

Harnstoff
Kreatinin
Methylguanidin
Guanidinoacetat
Guanidinoproprionsäure
Guanidinoacetessigsäure
Harnsäure
Phenolderivate
Sulfate
Phosphate
Oxalsäure
Cholin
aromatische und aliphatische Amine
Aceton
Insulin
Parathormon
Gastrin
Renin
Wachstumshormon
Calcitonin
Prolactin
Glucagon
Lysozym
Ribonuclease
cyclisches AMP

In Hinsicht auf eine Dialysierbarkeit wurden „Urämietoxine" nach ihrem Molekulargewicht eingeteilt.
So rückten in den letzten Jahren sogenannte „Mittelmoleküle" mit einem Molekulargewicht zwischen 500 und 5 000 (10 000) Dalton in den Mittelpunkt der Forschungen. Sie wurden primär von TENCHOFF und CURTIS (1970) beschrieben, die feststellten, daß Patienten, die mit einer Peritonealdialyse behandelt wurden, gegenüber Hämodialysepatienten seltener Neuropathien entwickelt hatten.
BABB et al. (1971) fanden, daß das Peritoneum für Substanzen zwischen 1 000 und 2 000 Dalton besser permeabel war als die bei der Hämodialyse verwendeten Zellulosemembranen.
Es wurde die Hypothese aufgestellt und nachfolgend in zahlreichen experimentellen und klinischen Untersuchungen gezeigt, daß die sogenannten schwer dialysablen „Mittelmoleküle" eine wichtige Ursache der komplexen urämischen Störung darstellen (ASABA et al., 1983 a, b; BERGSTRÖM et al., 1979; BRUNNER et al., 1976, 1978, 1979; CICHOCKI et al., 1980; CONTRERAS et al., 1982; RICARDO et al., 1979; EGGERT, 1981; FÜRST et al., 1975; FUNCK-BRENTANO et al., 1975, 1976; NAVARRO et al., 1979; DZURIK et al., 1973; RINGOIR et al., 1980; SCIGALLA et al., 1980 a, b, 1981).
Daraufhin wurde die Dialysetechnik durch Entwicklung und Einführung von Membranen mit größerer Permeabilität für mittelmolekulare Substanzen verändert.

Obwohl sich eine große Anzahl von Autoren mit Untersuchungen über die chemische Natur, die Isolierung und biologische Charakterisierung befaßt, sind die derzeitigen Kenntnisse über die „Mittelmoleküle" und ihre Rolle in der chronischen Niereninsuffizienz jedoch noch unzureichend, was vor allem aus der extremen Komplexität des biologischen

Materials (urämisches Plasma), der Kompliziertheit der Separationstechniken und der geringen Konzentration der Substanzen im Plasma resultiert (CONTRERAS et al., 1982; NAVARRO et al., 1982).

Eine Reihe von Untersuchern haben Serum-Fraktionen im Mittelmolekülbereich aus urämischem Serum isoliert und ihre vielfältigen Wirkungen in biologischen Modellen charakterisiert:

- Hemmung der Lymphozytentransformation (HANICKI et al., 1976; BOVERMANN et al., 1980)
- Hemmung der E-Rosettenbildung (ABIKO et al., 1978)
- Hemmung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit (CUEILLE et al., 1981; FUNCK-BRENTANO et al., 1975)
- Hemmung der Phagozytose (RINGOIR et al., 1980)
- Hemmung der Glukose-Utilisation in verschiedenen Geweben (DZURIK et al., 1973)
- Hemmung der Leukozyten-Migration (CICHOCKI et al., 1980)
- Hemmung der Proliferation verschiedener Zellinien (NAVARRO et al., 1979)
- Hemmung der Lymphozytenproliferation (BERGSTRÖM et al., 1979)

Im Zusammenhang mit der bei Niereninsuffizienz auftretenden renalen Anämie sind die Wirkungen der „Urämietoxine" auf das erythropoetische System von besonderem Interesse, da diese als Ursache für die beobachtete Hemmung der Erythropoese in Frage kommen (s. 1.).
Verschiedene Untersucher fanden eine Hemmwirkung des Serums von Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz auf die Erythropoese.

Der inhibitorische Effekt von urämischem Serum wurde in vivo (Polyzythämische Maus) (s. 5.) an einem verringerten ^{59}Fe-Einbau in die peripheren roten Blutzellen gezeigt (MORIYAMA et al., 1970; SCIGALLA et al., 1980 a, b).
In Knochenmarkkulturen konnten ebenfalls Hemmwirkungen auf die Hämoglobinsynthese demonstriert werden (MORIYAMA et al., 1975; BRUNNER et al., 1976, 1979; WALLNER et al., 1976).
Einige Untersucher wiesen darauf hin, daß Inhibitoren auch auf einer früheren Stufe der erythroiden Differenzierung eine Rolle für die Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz spielen könnten.
Es wurden Hemmeffekte auf die BFU-E und die CFU-E von Ratten- und Humanknochenmarkkulturen beschrieben (HELLWEGE et al., 1978; Mc GONIGLE et al., 1984 a, b; OHNO et al., 1977, 1978).

3. Material und Methoden

3.1. Vorbereitungen für die Kultivierung fötaler Mäuseleberzellen

3.1.1. Reinigen und Sterilisieren von Geräten und Instrumenten

Um unspezifische Einflüsse auszuschließen, die das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zellen in der Kultur beeinflussen und damit den Nachweis sowohl stimulierender als auch hemmender Faktoren stören können, wurden alle mit der Kultivierung der Zellen in Berührung kommenden Geräte und Instrumente einem speziellen Reinigungsregime unterworfen.

Glas- und Plastegeräte:

- Einlegen aller Geräte in eine Lösung von 30 g Na_2CO_3 und 30 g Na_3PO_4 in 10 l Wasser, 10 - 20 min kochen
- Spülen unter fließendem Wasser
- Aufbewahren aller Geräte in 10 %iger H_2SO_4 für 12 - 24 h
- Spülen unter fließendem Wasser
- Lagerung in destilliertem Wasser für 12 - 24 h
- mehrfaches Spülen aller Geräte mit dreifach destilliertem Wasser.

Metallinstrumente:

- Auskochen in einer Fitlösung
- Spülen mit destilliertem Wasser

Glas- und Metallgeräte wurden zwei Stunden bei 160 bis 180° C sterilisiert.

Die Sterilisation der Plast- und Gummimaterialien erfolgte 30 Minuten im Schnellkochtopf (SKT Union, Quedlinburg) oder über Nacht bei 80° C im Wärmeschrank.
Die zur Sterilfiltration von Zellzuchtmedien und Testflüssigkeiten (Plasmen, Ultrafiltrate) verwendeten Ganzglas-G-5-Bakterienfilter (Saale-Glas GMbH, Jena) wurden einer gesonderten Reinigung durch ein Gemisch aus konzentrierter H_2SO_4 und 2 % konzentrierter HNO_3 (Stehen über Nacht) und anschließende gründliche Spülung mit ein- und dreifach destilliertem Wasser unterzogen.
Die für alle Sterilarbeiten benutzte Laminarbox (1920 GV, VEB Elektromat Dresden) wurde vor Versuchsbeginn mit 70 %igem Äthanol gesäubert.

3.1.2. Präparation des Zellzuchtmediums, der Testplasmen sowie der Erythropoietin-Standards

Zur Kultur wurde das Zellzuchtmedium Mc Coy's 5 A (SERVA, Feinbiochemica Heidelberg) verwendet. 100 ml des nach Firmenvorschrift bereiteten Mediums wurden zur Stabilisierung des pH-Wertes 2 ml einer 1 M HEPES-Pufferlösung (PH = 7,4) (SERVA, Feinbiochemica Heidelberg) und zur Vermeidung von Infektionen Penicillin G (5000 IE/ 100 ml) und Streptomycin (5 mg/100 ml) zugesetzt.
Das Zellzuchtmedium wurde mit Hilfe von Ganzglas G-5-Bakterienfiltern sterilisiert und vor Kulturbeginn mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) (Flow Laboratories, Großbritannien) durchmischt. Das FKS war bereits sterilisiert, hitzeinaktiviert und mykoplasmenfrei.
Vor der Testung in der FMLZ-Kultur wurden alle Seren bzw. Plasmen hitzeinaktiviert (56° C, 30 min, Wasserbad).

Zur Standardisierung und Erprobung der FMLZ-Kultur wurde der Erythropoietin-Standard Step 3 mit 0,715 E EPO/mg Protein (Connaught Laboratories, Kanada) benutzt, der aus dem Plasma von mit Phenylhydrazin behandelten Schafen gewonnen war. Er ist gegen eine internationale Referenzpräparation geeicht. Der in lyophilisierter Form vorliegende Standard wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst (Konz. 1 E/ml).

Zusätzlich wurde ein gepooltes anämisches Mäuseplasma (Hämatokrit = 0,10) mit einer Erythropoietin-Konzentration von 20 E/ml (FMLZ-Methode), das nach WAHNER (1983) von bestrahlten (600 rad) und mit Phenylhydrazin behandelten (60 µg/kg) Mäusen erhalten wurde, getestet.
Dieses Plasma wurde vom Zentralinstitut für Hämatologie und Transfusionswesen der UdSSR zur Verfügung gestellt (WAHNER, 1983).
Es wurde ebenfalls bei 56° C für 30 min inaktiviert, sterilfiltriert und in einer Konzentration von 1 E/ml, 20fach verdünnt mit physiologischer Kochsalzlösung, verwendet.
Die menschlichen Plasmen sowie die in gelöster Form vorliegenden EPO-Standards und das anämische Mäuseplasma wurden in 1 ml-Portionen bei -20° C im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

3.1.3. Herstellung der fötalen Mäuseleberzell-Suspension

Zur Gewinnung von Mäuseföten definierten Alters wurden Männchen und Weibchen des vermehrungsfreudigen Inzuchtstammes BALB C für 48 h im Verhältnis 1 : 3 gepaart. Unter diesen Bedingungen wurde im Durchschnitt von 50 Versuchen ein Drittel der weiblichen Tiere schwanger.

Die Muttertiere wurden am 13. ($\pm$ 1 d) Gestationstag durch cerebrale Dislokation getötet und die Föten unter keimarmen Bedingungen entnommen. Ihre Zahl schwankte zwischen 2 und 13, im Durchschnitt 5 bis 6 Föten pro Maus. Bis zur Entnahme der Lebern wurden die Föten in steriler isotoner Kochsalzlösung bei 37° C aufbewahrt. Die Abtrennung der Lebern vom übrigen fötalen Gewebe erfolgte unter sterilen Bedingungen in der Laminarbox. Die Lebern wurden in das Zellzuchtmedium überführt und mit Hilfe von Pasteur-Pipetten und Passieren durch S_1-Kanülen disaggregiert. Zur Abtrennung größerer Zellaggregate, die die Zellzahl in der Kultur und damit das Testergebnis verfälschen würden, wurde mehrmals durch Kunststoffsiebe mit einer Maschenweite von 100 µm filtriert.
Von einem 13 $\pm$ 1 Tage alten Föten wurden annähernd 10^7 fötale Leberzellen gewonnen.

Die Anzahl der kernhaltigen Zellen in der Suspension wurde nach Verdünnung mit 3 %iger Essigsäure (Verdünnung 1 : 10) in einer Blutzellzählkammer nach NEUBAUER bestimmt.
Dazu wurden stets zwei Verdünnungen angefertigt und diese mehrmals ausgezählt. Durch Zugabe von Zellzuchtmedium wurde eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml eingestellt und anschließend kontrolliert.
Zur Bestimmung des Anteils toter Zellen wurden 0,9 ml der Zellsuspension mit 0,1 ml einer 0,5 %igen Lösung von Trypanblau versetzt und nach 10 min der Anteil der toten (blau gefärbten) Zellen in einer NEUBAUER-Zählkammer ermittelt. Es ergab sich, daß unter den gegebenen Bedingungen mehr als 90 % der Zellen vital blieben.

3.2. Durchführung der fötalen Mäuseleberzell-Kultivierung

Im folgenden wird der chronologische Ablauf der FMLZ-Kultivierung beschrieben.

Zum Versuchstag:

- Reinigen und Sterilisieren der Geräte und Instrumente (s. 3.1.1.)
- Blutabnahmen bei den Patienten und Probanden und Vorbereitung der Testplasmen (s. 3.1.2.)

Am Versuchstag:

- Vorbereiten und Vorwärmen der als Inkubationsgefäße dienenden Exsikkatoren bei 37° C im Brutschrank
- Aufheizen des Thermostaten (37° C)
- Vorbereitung des Arbeitsplatzes unter der Laminarbox
- Präparation des Zellzuchtmediums (s. 3.1.2.)
- langsames Auftauen des zu testenden Plasmas und des EPO-Standards
- Aufbau der Verdünnungsreihe mit Testplasmen und EPO-Standard
  Hierzu wurden in 10 ml-Zentrifugengläsern, die als Kulturgefäße dienten, je 5 Konzentrationen des EPO-Standards, gegebenenfalls des anämischen Mäuseplasmas bzw. der Testplasmen, gegeben; z.B. 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 µl/Kultur. Um die Einheitlichkeit der Kulturbedingungen zu erreichen, wurden die unterschiedlichen Testvolumina mit 0,9 % NaCl-Lösung auf 100 µl ergänzt. Als Kontrolle diente eine Gruppe unstimulierter Kulturen, in der die Standard- bzw. Testsubstanz durch 100 µl 0,9 % NaCl-Lösung ersetzt worden war. Generell wurden 4 Parallelbestimmungen pro Konzentration durchgeführt, von denen Mittelwert und Standardabweichung berechnet wurden.

- Herstellung der FMLZ-Suspension (s. 3.1.3.)
- Verteilen von je 1 ml der definierten Zellsuspension (5×10^5 Zellen/ml) auf die vorbereiteten Zentrifugengläser.
  Beim Aliquotieren der Zellsuspension wurde durch ständiges Umherwirbeln gesichert, daß die Homogenität der Suspension erhalten blieb.
- Aufwärmen der Gläser bei 37° C im Thermostaten
- Inkubation für 24 Stunden bei 37° C in einer 5 % CO_2 enthaltenden mit Wasserdampf gesättigten Athmosphäre. Diese wurde durch Zugabe von 60 ml Wasser, 2 g Zitronensäure-1-hydrat (VEB Labor- und Feinchemikalien) und zwei Tabletten $NaHCO_3$ (je 0,45 g) (VEB Berlin-Chemie) in die benutzten, luftdicht verschlossenen 5-Liter-Exsikkatoren erzeugt.
- Radiomarkierung
  Nach 20stündiger Inkubation bzw. zum Zeitpunkt der beabsichtigten Impulsmessung wurden $3{,}7 \times 10^4$ Bq = 1 μCi ^{3}H-Thymidin (UVVR, ČSSR) (gelöst in 0,1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung, spezifische Aktivität: $81{,}4 \times 10^{10}$ Bq/mMol) zupipettiert
- Zusammensetzung des Testansatzes:
  0,1 ml Testlösung bzw. Kontrollösung
  (EPO-Standard, Plasma bzw. 0,9 % NaCl-Lösung)
  1,0 ml Zellsuspension mit 5×10^5 Zellen
  0,1 ml ^{3}H-TdR-Lösung

  Zur Bestimmung der inhibitorischen Wirkung von Plasmen auf den EPO-stimulierten ^{3}H-TdR-Einbau wurde der Testansatz modifiziert:

  0,05 ml EPO-Standard (= 0,05 E)
  0,1 ml Testplasma (normal bzw. urämisch) bzw.
  0,9 % NaCl-Lösung (Kontrolle)
  1,0 ml Zellsuspension mit 5×10^5 Zellen
  0,1 ml ^{3}H-TdR-Lösung

- Abstoppen 4 h nach ^{3}H-TdR-Zugabe durch Kühlen auf 0° C im Eisbad
  Nach Abzentrifugieren der Zellen mit der Tischzentrifuge T 30 (MLW) (2 - 3 min bei 1000 U/min) konnten die Zellsedimente bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20° C aufbewahrt werden.

- Ausfällung der DNS und Auswaschung des nicht eingebauten ^{3}H-TdRs zur Messung des ^{3}H-TdR-Einbaus in die DNS der FMLZ:
  Dreimaliges Waschen der Zellen durch Aufwirbeln der abzentrifugierten Zellen, Zugabe von 5 ml eiskalter 5 %iger Trichloressigsäure und erneutes Abzentrifugieren (2 min, 3000 x g)

- Lösen des Sedimentes in 0,5 ml Hyamin10 X-Base (0,5 N Lösung von Methylbenzethoniumhydroxid in Toluol; SERVA)

- Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit zu der in Hyamin10 X-Base gelösten Probe
  Zusammensetzung der Szintillationsflüssigkeit:
  900 ml Toluol
  100 ml Triton X-100 (Ferak, Berlin-West)
  3 ml 100 %ige Essigsäure
  4 g PPO (2.5-Diphenyloxazol)
  0,1 g POPOP (2.2-p-Phenyl-bis-(5-phenoloxyzol))

- Messung des ^{3}H-TdR-Einbaus im Flüssigszintillationszählgerät (Liquid Scintillation Counter, LKB-Wallac 81000).
  Die Zählzeit betrug 1 min bei externem Standard.
  Die Einbauraten wurden in cpm (counts per minute) bzw. dpm (disntegrations per minute) angegeben.

3.3. Weitere Methoden

Zytologie

Zur zytologischen Charakterisierung der FMLZ wurden auf übliche Art angefertigte Ausstriche panoptisch mit der kombinierten MAY-GRÜNWALD-GIEMSA-Färbung nach Pappenheim gefärbt und differenziert (STOBBE, 1977).

Herstellung der Plasma-Ultrafiltrate

Zur Abtrennung höhermolekularer Substanzen, insbesondere des EPO aus den Testplasmen, wurden die Plasmen durch DIAFLO-Ultrafiltrationsmembranen UM 20 (Amicon) filtriert. Diese Membranen sind nur für Moleküle mit einem Molekulargewicht bis zirka 20 000 Dalton permeabel. Die EPO-freien Plasma-Ultrafiltrate wurden hitzeinaktiviert und sterilfiltriert.

Herstellung von dialysiertem Plasma

Zur Abtrennung niedermolekularer Komponenten aus den Plasmen wurde eine 20stündige Dialyse gegen 0,9 %ige Kochsalzlösung bei 4° C unter Verwendung von Nephrophan-Folie (Wolffen) als Dialysemembran durchgeführt.

3.4. Patienten und Probanden

Es wurden die Plasmen von 11 terminal niereninsuffizienten Kindern untersucht, die sich im Hämodialyse-Programm befinden.
Tabelle 2 gibt Auskunft über die Grunderkrankung, den Grad der Anämie und die Transfusionshäufigkeit sowie über die Nierenrestfunktion und das Hämodialyseregime der Patienten.

Alle Kinder waren schwer anämisch, ihre Hämatokritwerte (DAB 7) bewegten sich zwischen 0,19 und 0,26.
Eine Ausnahme bildete ein Junge, der zum Untersuchungszeitpunkt erst vier Monate im Hämodialyse-Programm war und noch keine so schwere Anämie entwickelt hatte (Hk 0,30).

Die Kinder benötigten durchschnittlich eine Transfusionseinheit (300 ml Erythrozyten-Konzentrat) pro Monat, wobei bei Hämatokritwerten kleiner als 0,20 transfundiert wurde, um die Zahl der Blutübertragungen so klein wie möglich zu halten.

Die Blutentnahmen erfolgten vor Beginn und für einige Untersuchungen auch am Ende der Hämodialyse.
Zur Gewinnung des Plasmas wurde heparinisiertes Blut in der Laborzentrifuge T 30 4 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Hämolytische Proben wurden verworfen. Es wurde konservierungsfreies Heparin verwendet. Die letzte Transfusion lag mindestens vierzehn Tage zurück.

Zusätzlich wurden die Plasmen von zehn hämatologisch und nephrologisch gesunden Probanden (Hk zwischen 0,43 und 0,49 ; Kreatinin im Serum zwischen 67 und 92 µmol/l) sowie die Plasmen von drei Patienten mit Polycythamia vera (Hk 0,58; 0,56; 0,56) und die Plasmen zweier Patienten mit einer aplastischen Anämie (Hk 0,20; 0,21) getestet (Kreatinin im Serum zwischen 62 bis 84 µmol/l).

Tabelle 2: Klinische und laborchemische Daten von 11 terminal niereninsuffizienten Kindern

Name d. Patienten	Alter (Jahre) Geschlecht	Grunderkrankung	Dialyse seit (Monate)	Serumwerte (v.D.)		Dialyse-Regime		Hämatokrit	Transfusion (TE/Mon.)
				Kreatinin (µmol/l)	Harnstoff (mmol/l)	Dialysezeit (h/Woche)	Kapillaroberfläche (m^2)		
D.K.	12 ♀	chron.Glomerulonephritis (binephrektomiert)	64	914	44	12	1,3	0,19	2
M.K.	11 ♂	chron.Glomerulonephritis (binephrektomiert)	40	748	14	15	1,3	0,21	2
M.Z.	7 ♂	chron. Pyelonephritis (binephrektomiert)	24	788	46	15	0,6	0,19	1,5
U.B.	15 ♂	chron. Pyelonephritis (binephrektomiert)	22	1074	29	12	1,8	0,19	1
T.W.	12 ♀	fam. juvenile Nephronophthise (2 Nieren)	16	919	31	12,5	1,3	0,20	1
A.K.	12 ♀	chron. Pyelonephritis (1 Niere)	15	1193	29	12	1,3	0,28	0
S.H.	6 ♂	primär hypoplast. Nieren (2 Nieren)	12	590	36	9	0,6	0,26	0
K.G.	15 ♂	chron. Pyelonephritis (binephrektomiert)	9	1118	36	12	1,3	0,20	1

Fortsetzung Tabelle 2

Name d. Patienten	Alter (Jahre) Geschlecht	Grunderkrankung	Dialyse seit (Monate)	Serumwerte(v.D.)		Dialyse-Regime		Hämatokrit	Transfusion (TE/Mon.)
				Kreatinin (µmol/l)	Harnstoff (mmol/l)	Dialysezeit (h/Woche)	Kapillaroberfläche (m^2)		
L.E.	15 ♂	chron. Pyelonephritis (1 Niere)	4	979	22	12	1,3	0,30	0
M.S.	13 ♀	chron.Glomerulonephritis (binephrektomiert)	1	920	21	9	1,3	0,24	0
F.L.	16 ♂	Alport-Syndrom (2 Nieren)	2	1093	24	9	1,3	0,20	1

3.5. Statistische Auswertung

Für alle der Arbeit zugrunde liegenden Daten wurden der arithmetische Mittelwert der Parallelmessungen ($\bar{x}$), die Standardabweichung (s) und der Variabilitätskoeffizient (v) bestimmt.

Zur Feststellung der Signifikanz von Mittelwertsunterschieden zwischen den Stichproben wurde der t-Test nach Student durchgeführt.

Die statistische Beschreibung des Zusammenhanges zwischen der Dosis der Testsubstanz und ihrer Wirkung erfolgte durch die Bestimmung des Regressionskoeffizienten (b).

Die Stärke des linearen Zusammenhanges wurde durch die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten (r) charakterisiert.

Linearität und Parallelität der log Dosis-log Wirkungs-Kurven wurden mit Hilfe der Varianzanalyse überprüft.
Zur Konzentrationsbestimmung von EPO bzw. ESA (s. 4.2.1.) in den Testsubstanzen (Plasmen) wurde, wie auch für die Varianzanalyse, ein Computer-Programm für Parallellinien-Bioassays benutzt (FINNEY, 1976).
Ziel der statistischen Auswertung war die Bestimmung des Dosisverhältnisses R (oder Titers = Dosis Standard/Dosis Testsubstanz) bei gleicher Wirkung. Es wurde vorausgesetzt, daß sich nach Logarithmieren der Dosis- und Wirkungswerte lineare Abhängigkeiten (Regressionsgeraden) ergeben. Der Regressionskoeffizient beider Geraden mußte gleich sein, um ein konstantes Dosisverhältnis für einen Konzentrationsbereich zu erhalten. Der Titer konnte aus dem Abstand der Regressionsgeraden auf der x-Achse bestimmt werden (FINNEY, 1976; RASCH et al., 1973).

Die Rechnungen wurden im Rechenzentrum am Zentralinstitut für Molekularbiologie der AdW der DDR mit dem Rechner ES 1010 durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung und Standardisierung der Methode

4.1.1. Morphologische Charakterisierung fötaler Mäuseleberzellen

Zur quantitativen und qualitativen Charakterisierung der fötalen Mäuseleber bzgl. der vorliegenden Zellarten wurden Ausstriche der zur Kultur verwandten Zellsuspension gefärbt und zytologisch differenziert (s. 3.3.).
Die Tabelle 3 weist aus, daß EPO-sensible Zellen dominieren.
Die Streuung der Einzelbefunde resultiert aus der Unschärfe, mit der der Konzeptionstermin und damit das Alter der fötalen Lebern variiert (s. 3.1.3.).

Tabelle 3: Zusammensetzung fötaler Mäuseleberzellen am 13 ± 1. Gestationstag (die Angaben entsprechen Mittelwerten von 10 Ausstrichen)

Zellart	Anteil in %, $\bar{x} \pm s$
Erythroblasten, basophil	32,3 ± 8,7
Erythroblasten, polychromatisch	24,1 ± 3,8
Erythroblasten, azidophil	22,9 ± 6,1
Proerythroblasten	10,6 ± 2,2
Makroblasten	9,7 ± 1,3
Sonstige	0,4 ± 0,3

Es konnte keine wesentliche Kontamination mit intakten Hepatozyten oder Zellen anderer hämatopoetischer Linien festgestellt werden.

4.1.2. Spontanes Proliferationsverhalten fötaler Mäuseleberzellen

Um das spontane Proliferationsverhalten der FMLZ ohne Zusatz stimulierender Faktoren zu charakterisieren, wurde der ^{3}H-TdR-Einbau während einer 24stündigen Inkubationszeit untersucht (s. Abb. 2). Der ^{3}H-TdR-Einbau wurde während dieser Periode zu verschiedenen Zeitpunkten nach zweistündigen Markierungsperioden gemessen.

Die spontane DNS-Synthese der FMLZ nahm mit zunehmender Inkubationsdauer ab, sichtbar am Abfall des ^{3}H-TdR-Einbaus. Im Ergebnis von acht Versuchen zeigte sich, daß während der Inkubation die Zellzahl nur unwesentlich von $4{,}3 \pm 0{,}5 \times 10^{5}$ Zellen/ml vor Inkubation auf $4{,}2 \pm 0{,}6 \times 10^{5}$ Zellen/ml nach Inkubation abfiel.

Zusätzlich zur Zellzahlbestimmung wurden Zellausstriche angefertigt. Nach 24stündiger Inkubation ohne EPO zeigte die Zelldifferenzierung eine deutliche Verschiebung zu reiferen Formen der erythroiden Reihe (s. Abb. 3). Der Anteil toter Zellen war mit weniger als 10 % nicht wesentlich erhöht.

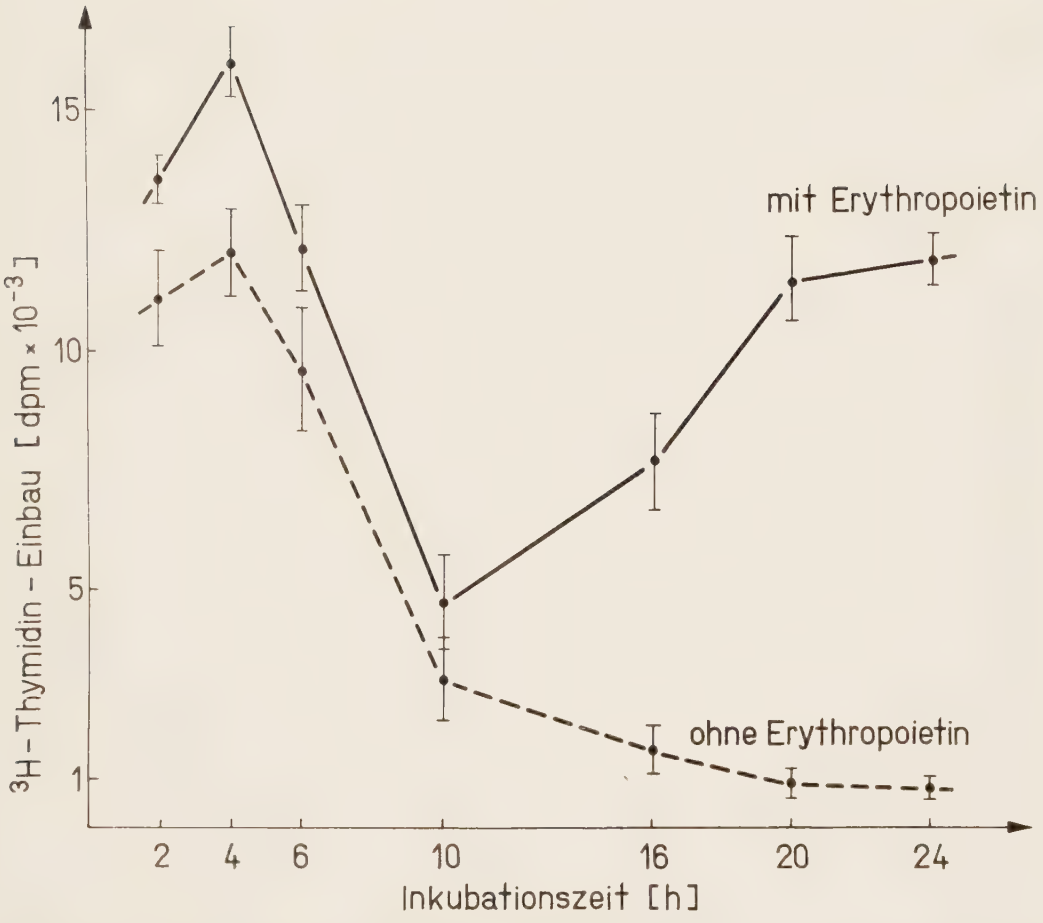

Abb. 2: Zeitlicher Verlauf des spontanen und des durch Erythropoietin (0,05 E) stimulierten ^{3}H-TdR-Einbaus in fötale Mäuseleberzellen in vitro. (Der ^{3}H-TdR-Einbau wurde während einer 24stündigen Inkubationszeit zu verschiedenen Zeitpunkten nach 2stündigen Markierungsperioden gemessen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen von je 4 Parallelbestimmungen eines typischen Experimentes).

4.1.3. Stimulierung der DNS-Synthese fötaler Mäuseleberzellen durch Erythropoietin

Bei Zugabe von EPO (0,05 E) zum Testansatz trat eine Stimulierung der DNS-Synthese ein, was in der 24-h-Kultur an einer erneuten Zunahme des ^{3}H-TdR-Einbaus - nach initialem An- und Abstieg wie bei den unstimulierten Kulturen - sichtbar wurde.
Der Abb. 2 kann man entnehmen, daß die EPO-Wirkung nach etwa 12 h einsetzt. Nach 16 h wurde im Vergleich zu unstimulierten Kulturen ein 6,1-fach, nach 24 h ein 14,9-fach stärkerer ^{3}H-TdR-Einbau gemessen.
Der ebenfalls erhöhte ^{3}H-TdR-Einbau der stimulierten Kulturen in den ersten Inkubationsstunden ist auf einen „Sofort-Effekt" des EPO zurückzuführen. Wegen der geringen Differenz zur Kontrollgruppe wurde jedoch nicht untersucht, ob dieser „Sofort-Effekt" im Sinne der Zielstellung der Arbeit zum Nachweis stimulierender oder hemmender Effekte brauchbar ist.
Es ist klar erkennbar, daß die Stimulierung der Kultur durch EPO am deutlichsten zwischen 20 und 24 h meßbar ist, sowohl absolut als auch relativ (im Hinblick auf die niedere Basislinie der unstimulierten Kultur). Hier besteht die größte Differenz zur Kontrollgruppe. Es wurden daher alle weiteren Untersuchungen in diesem Zeitintervall durchgeführt.
Zellzählungen und -differenzierungen nach der 24stündigen Inkubation mit EPO ergaben, daß sich die Zellzahl im Durchschnitt von 8 Versuchen um rund 50 % erhöht hatte, wobei die absolute Zahl der Proerythroblasten, Makroblasten und basophilen Erythroblasten annähernd gleich blieb, verbunden mit einer Zunahme der reiferen Zellen der erythroiden Reihe (s. Abb. 3).

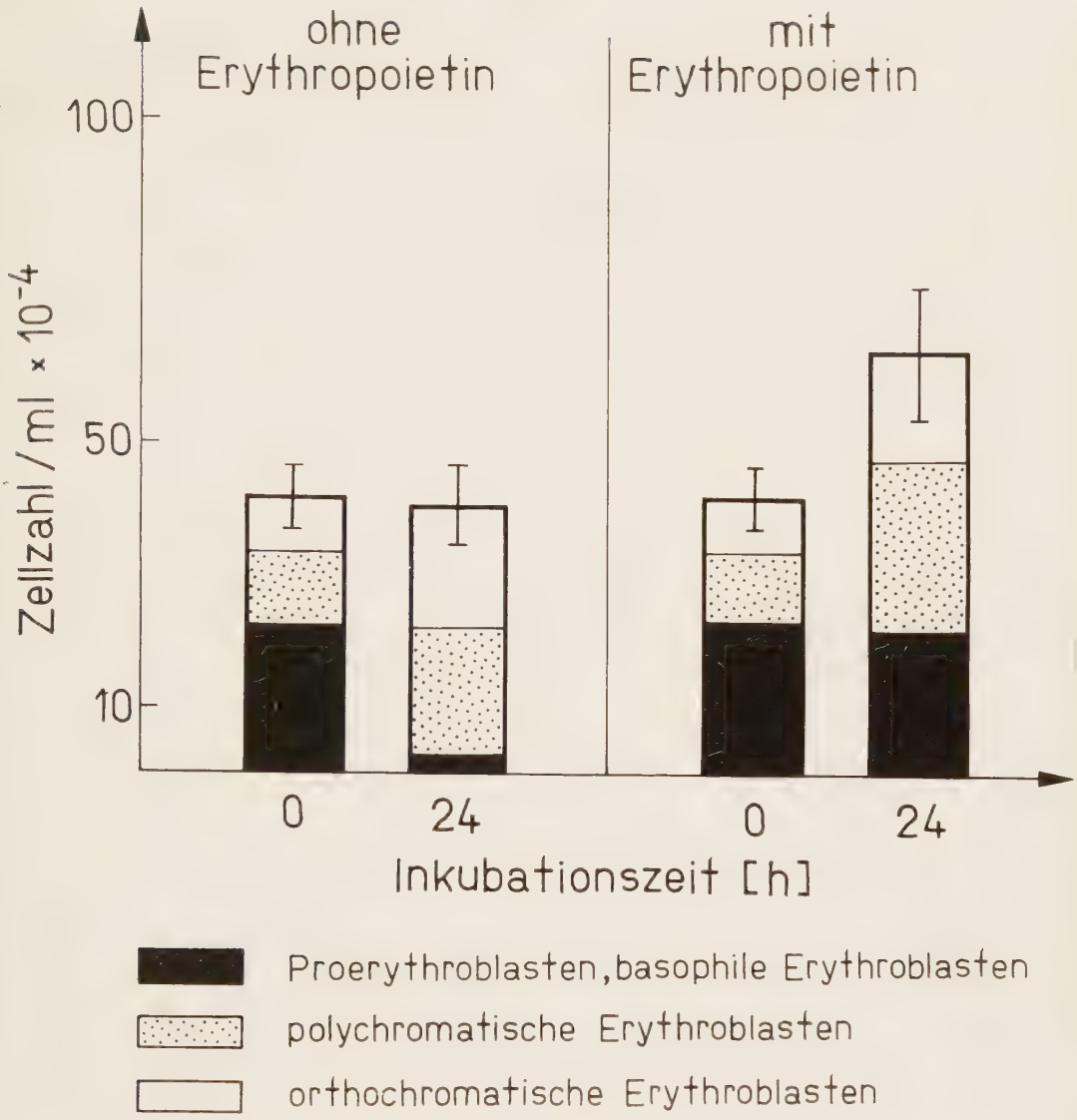

Abb. 3: Der Effekt einer 24stündigen Kultivierung mit Erythropoietin (0,05 E) auf die Zahl und das Differentialbild eine 13 ± 1 Tage alten fötalen Mäuseleberzell-Population (Die Werte repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichung von acht Experimenten).

Die stimulierende Wirkung des EPO auf den ^{3}H-TdR-Einbau in FMLZ konnte in allen weiteren Versuchen reproduziert werden.

Für die praktische Anwendung der Methode muß jedoch die interexperimentelle Variabilität beachtet werden.
Sie äußert sich darin, daß die ^{3}H-TdR-Einbauraten der unstimulierten Kontrollkulturen bei gleicher Zellzahl von Versuch zu Versuch verschieden hoch sind (s. Tabelle 4).
Um die Ergebnisse der verschiedenen Versuche vergleichen zu können, wurde der ^{3}H-TdR-Einbau der Kontrollkultur gleich 100 % gesetzt.
Analog wurden auch die mit den Testsubstanzen erhaltenen Ergebnisse nicht absolut (in dpm), sondern in Prozent des in jedem Versuch mitgeführten Wertes der unstimulierten Kontrollkultur angegeben und verglichen:

$$\% \text{ EPO-Antwort} = \frac{^{3}\text{H-TdR-Einbau, EPO-stimulierte Kultur}}{^{3}\text{H-TdR-Einbau, unstimulierte Kontrollkultur}} \times 100$$

Darüber hinaus ist die stimulierende Wirkung des Hormons EPO auf den ^{3}H-TdR-Einbau bei gleicher Konzentration von Versuch zu Versuch unterschiedlich (s. Tabelle 4).
Der durch EPO (0,05 E/5 x 10^{5} Zellen/Kultur) erhöhte ^{3}H-TdR-Einbau betrug im Durchschnitt von 14 Versuchen das 9,2fache der Kontrollkultur und variierte erheblich im Bereich von 3,9 bis 14,5fach.

Tabelle 4: Reproduzierbarkeit der stimulierenden Wirkung des Erythropoietins (0,05 E)

Versuchs-Nr.	^{3}H-TdR-Einbau (dpm) Kontrollkultur $\bar{x}$	±	s	(v)	Stimulierte Kultur $\bar{x}$	±	s	(v)	Stimulationsfaktor
1	4 463	±	350	(7,8 %)	64 854	±	426	(0,6 %)	14,5
2	6 546	±	377	(5,7 %)	55 531	±	2 299	(4,1 %)	8,5
3	12 978	±	291	(2,2 %)	97 125	±	8 496	(8,7 %)	7,5
4	6 416	±	945	(14,7 %)	91 853	±	1 580	(1,7 %)	14,3
5	7 445	±	345	(4,6 %)	42 483	±	1 211	(2,8 %)	5,7
6	4 474	±	595	(13,3 %)	35 610	±	489	(1,4 %)	8,0
7	3 346	±	480	(14,3 %)	29 091	±	1 801	(6,2 %)	8,7
8	6 230	±	370	(5,9 %)	31 073	±	2 080	(6,7 %)	5,0
9	3 286	±	150	(4,6 %)	31 609	±	2 656	(8,4 %)	9,6
10	4 698	±	410	(8,7 %)	65 792	±	3 250	(4,9 %)	14,0
11	3 353	±	140	(4,2 %)	40 548	±	3 871	(9,5 %)	12,1
12	6 128	±	123	(2,0 %)	38 391	±	513	(1,3 %)	6,3
13	4 693	±	285	(6,1 %)	48 849	±	1 979	(4,0 %)	10,4
14	6 633	±	793	(11,9 %)	25 762	±	4 551	(17,7 %)	3,9
									Ø 9,2 ± 3,5

Der Variabilitätskoeffizient der pro Meßpunkt durchgeführten 4 Parallelbestimmungen lag im Durchschnitt deutlich unter 10 % (s. die in den Tabellen 4 und 5 angegebenen Werte). Die Standardabweichung wird daher in den folgenden Abbildungen nur angegeben, wenn dies ohne Einbuße an Übersichtlichkeit möglich ist.

Um zu untersuchen, in welcher Weise die Höhe des ^{3}H-TdR-Einbaus von der EPO-Konzentration abhängig ist, wurde die EPO-Konzentration im Versuchsansatz variiert.
Die erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven hatten im Konzentrationsbereich zwischen 0,006 und 0,100 E EPO pro Kultur (1,2 ml) einen exponentiellen Verlauf.
Die Abb. 4 zeigt ein typisches Beispiel.
Die minimale EPO-Dosis, die noch einen zur Kontrollkultur signifikant verschiedenen ^{3}H-TdR-Einbau verursachte, betrug 0,005 E. Die Kurve erreichte bei 0,100 - 0,200 E den Sättigungsbereich.

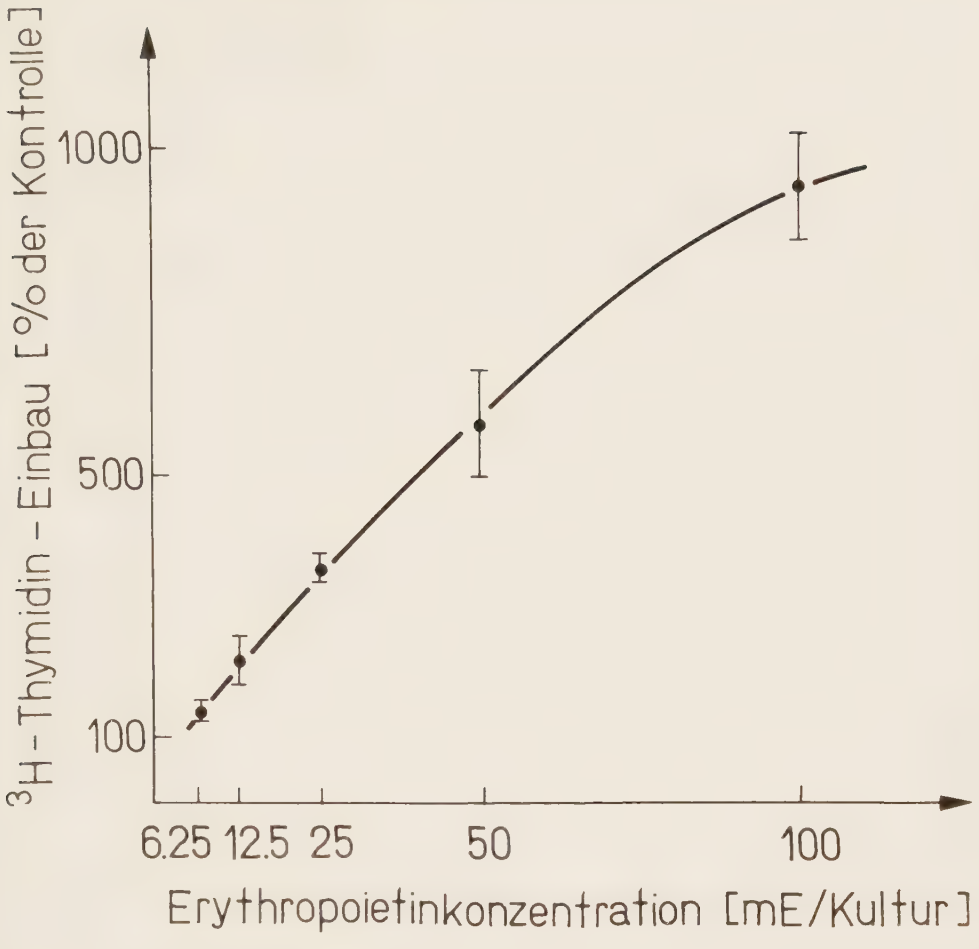

Abb. 4: Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Erythropoietin auf den ^{3}H-TdR-Einbau in fötale Mäuseleberzellen in vitro.
(Der ^{3}H-TdR-Einbau wurde am Ende der 24stündigen Inkubation in einer 4stündigen Markierungsperiode gemessen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen von je 4 Parallelbestimmungen eines typischen Experimentes).

Nach doppelt-logarithmischer Transformation der Dosis-Wirkungs-Kurve ergab die graphische Darstellung eine Gerade. Diese Form ist im Sinne der Zielstellung der Arbeit besonders geeignet für den Vergleich einer Standard- und einer Testsubstanz.
Die positive Korrelation zwischen dem Logarithmus der Dosis und dem Logarithmus der Wirkung war durch einen hohen Korrelationskoeffizienten r charakterisiert (s. Abb. 5).

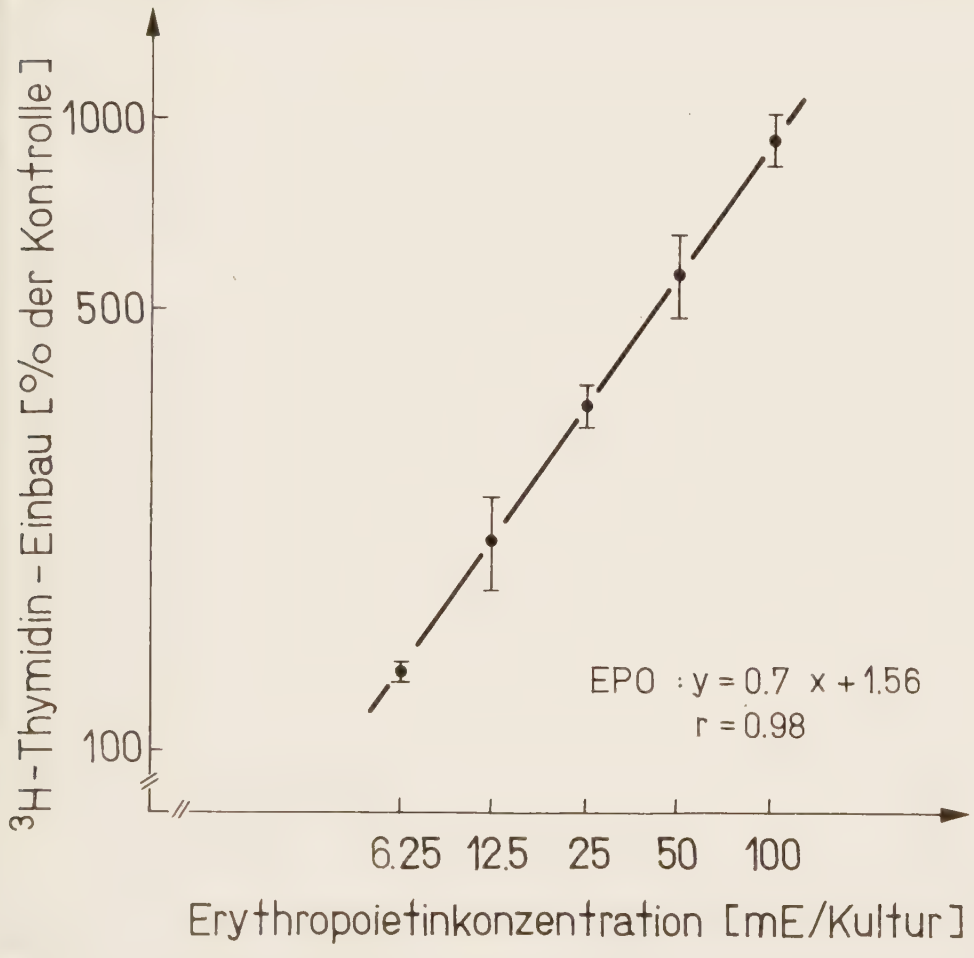

Abb. 5: Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Erythropoietin auf den ^{3}H-TdR-Einbau in fötale Mäuseleberzellen in vitro: Log Dosis-log Wirkungs-Kurve (Der ^{3}H-TdR-Einbau wurde am Ende der 24stündigen Inkubation in einer 4stündigen Markierungsperiode gemessen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von je 4 Parallelbestimmungen eines typischen Experimentes).

Wie bereits beschrieben (s. Tabelle 4), wurden bei gleicher EPO-Konzentration und gleicher Zellzahl in verschiedenen Experimenten verschieden hohe ^{3}H-TdR-Einbauraten erhalten. Dies fand auch seinen Ausdruck in einer unterschiedlichen Lage der Dosis-Wirkungs-Kurven in unterschiedlichen Versuchen.

In der Abb. 6 sind die in verschiedenen Experimenten erhaltenen log Dosis-log Wirkungs-Kurven für EPO zusammengestellt. Sie variieren sowohl im Anstieg als auch hinsichtlich der Lage.

Die Unterschiede sind, wie die hohen Korrelationskoeffizienten (r) belegen, nicht durch versuchsinterne Streuung der Meßwerte bedingt, sondern durch die von Experiment zu Experiment variierenden Bedingungen, die vor allem durch die jeweilige FMLZ-Präparation bestimmt werden. Es ist daher erforderlich, die Standardkurve in jedem Experiment - als Bezugswert - neu zu bestimmen.

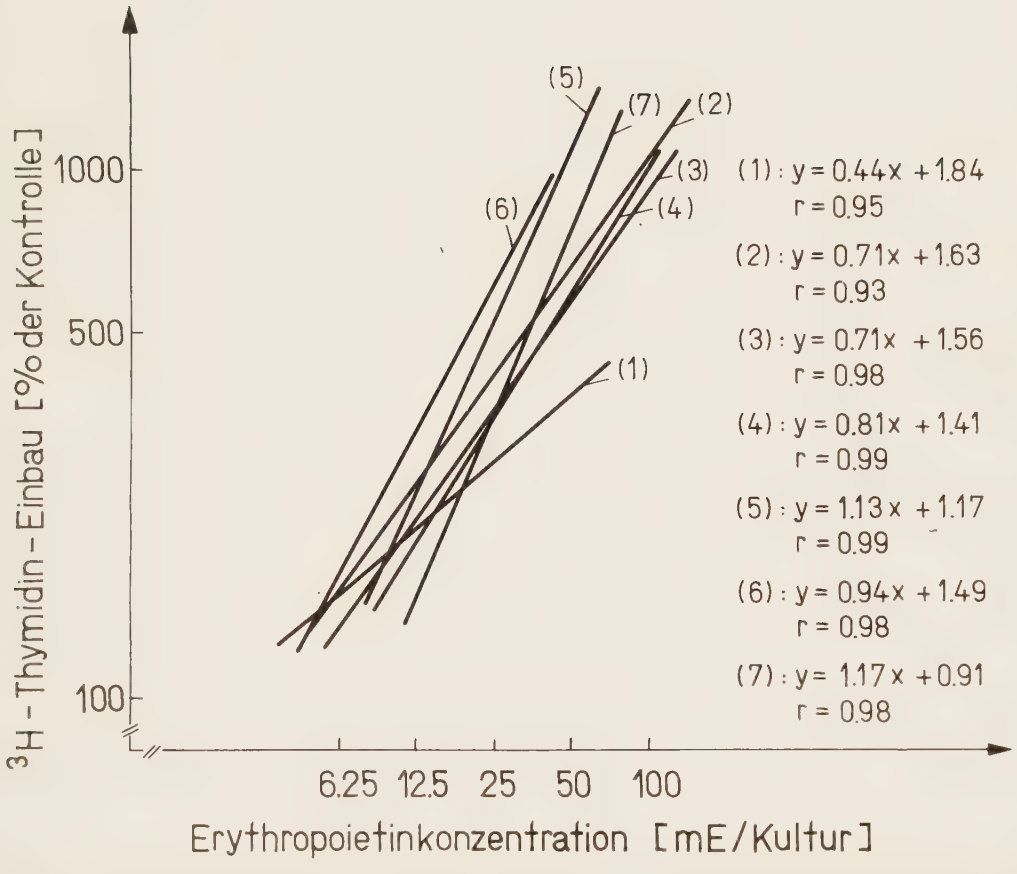

Abb. 6: Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Erythropoietin auf den ^{3}H-TdR-Einbau in fötale Mäuseleberzellen in vitro: Log Dosis-log Wirkungs-Kurven aus unterschiedlichen Experimenten (Der ^{3}H-TdR-Einbau wurde am Ende der 24stündigen Inkubation in einer 4stündigen Markierungsperiode gemessen. Die Kurven resultieren aus den Mittelwerten von je 4 Parallelbestimmungen, die für 3 - 5 EPO-Konzentrationen ermittelt wurden).

4.1.4. Stimulierung der DNS-Synthese fötaler Mäuseleberzellen durch anämisches Mäuseplasma

Um zu überprüfen, ob anstelle des internationalen EPO-Standards, der nur in begrenzter Menge zur Verfügung stand, auch Plasma mit hohem EPO-Gehalt verwendet werden kann, wurde ein anämisches Mäuseplasma in die Untersuchung mit einbezogen und seine Aktivität mit dem EPO-Standard verglichen.

Wie der Abb. 7 zu entnehmen ist, ergaben sich nach Stimulierung der Kulturen durch verschiedene Dosen des EPO-Standards und des anämischen Mäuseplasmas identische Dosis-Wirkungs-Kurven, nachdem das anämische Plasma zur Herabsetzung des hohen EPO-Titers mit isotoner Kochsalzlösung (s. 3.1.2.) verdünnt worden war. Bei 20facher Verdünnung bewirkten gleiche Volumina des EPO-Standards (1 E/ml) und des Plasmas gleiche Stimulationsraten. Das anämische Mäuseplasma erwies sich somit als laboreigener Ersatzstandard für EPO verwendbar. Die zusätzliche Belastung der FMLZ-Kulturen durch Mäuseplasma war mit maximal 0,42 % (bei Verwendung von 100 µl des 20fach verdünnten Plasmas pro Kultur) zu vernachlässigen.
Die übereinstimmende stimulierende Aktivität von EPO-Standard und anämischem Mäuseplasma konnte reproduziert werden. Die Abb. 7 zeigt die log Dosis-log Wirkungs-Kurven von EPO-Standard und anämischem Mäuseplasma zweier Versuche und belegt trotz unterschiedlicher Lage die Reproduzierbarkeit der Methode.

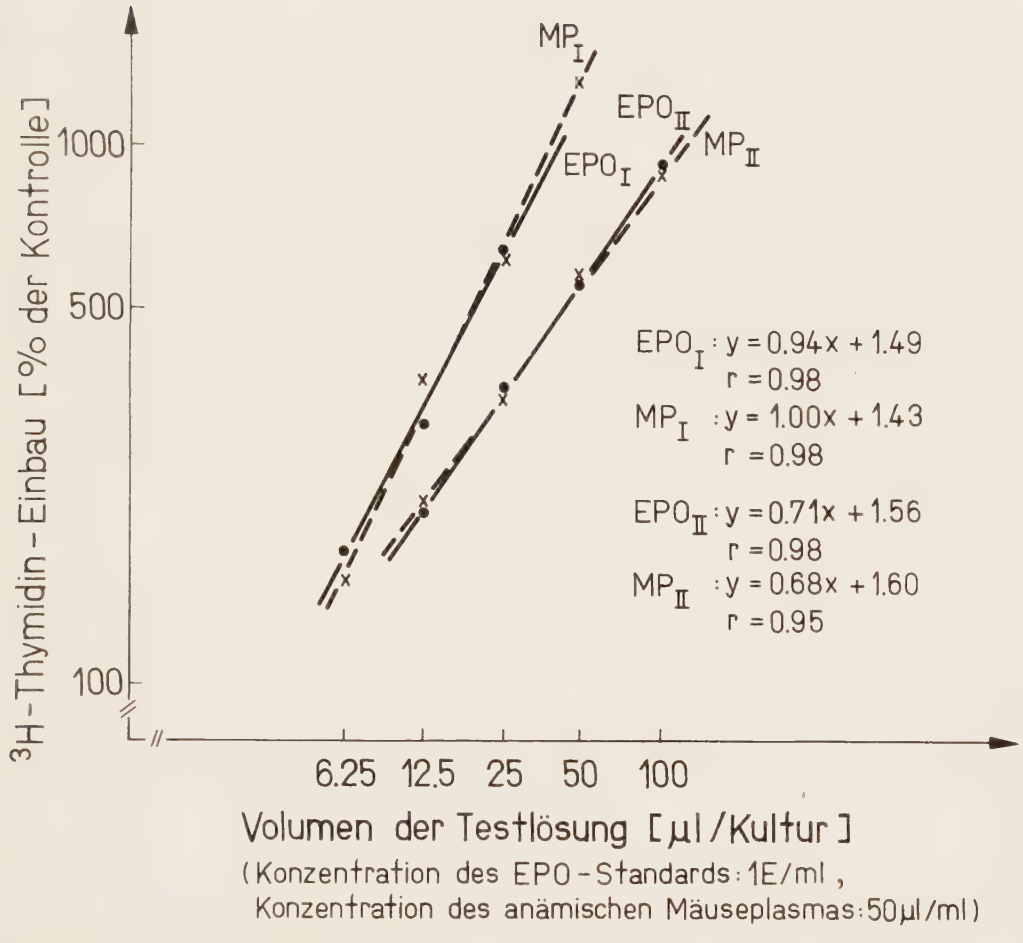

Abb. 7: Vergleich der Wirkungen von Erythropoietin und einem anämischen Mäuseplasma auf den ^{3}H-TdR-Einbau in fötale Mäuseleberzellen in vitro:
Log Dosis-log Wirkungs-Kurven zweier Experimente (Der ^{3}H-TdR-Einbau wurde am Ende der 24stündigen Inkubation in einer 4stündigen Markierungsperiode gemessen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte von je 4 Parallelbestimmungen, die für 4 EPO- bzw. Plasma-Konzentrationen ermittelt wurden).

4.1.5. Versuche zur Optimierung der Methode

Die Empfindlichkeit der FMLZ-Kultur zur Bestimmung stimulierender und hemmender Effekte auf die DNS-Synthese erythroider Zellen ist abhängig von der Intensität des ^{3}H-TdR-Einbaus der kultivierten Zellen. Zur Optimierung dieses Meßparameters wurde daher überprüft, wie sich unterschiedliche Serumanteile im Kulturmedium und Variationen der Zelldichte (Zellzahl/Volumeneinheit) im Kulturansatz auswirken.
Die Abb. 8 zeigt, daß bei einem Serumanteil (FKS) von 10 % im Kulturmedium ein wesentlich höherer ^{3}H-TdR-Einbau durch 0,05 E EPO stimuliert wird als mit nur 5 % FKS, die weitere Erhöhung auf 20 % FKS jedoch keinen wesentlichen Effekt hatte.

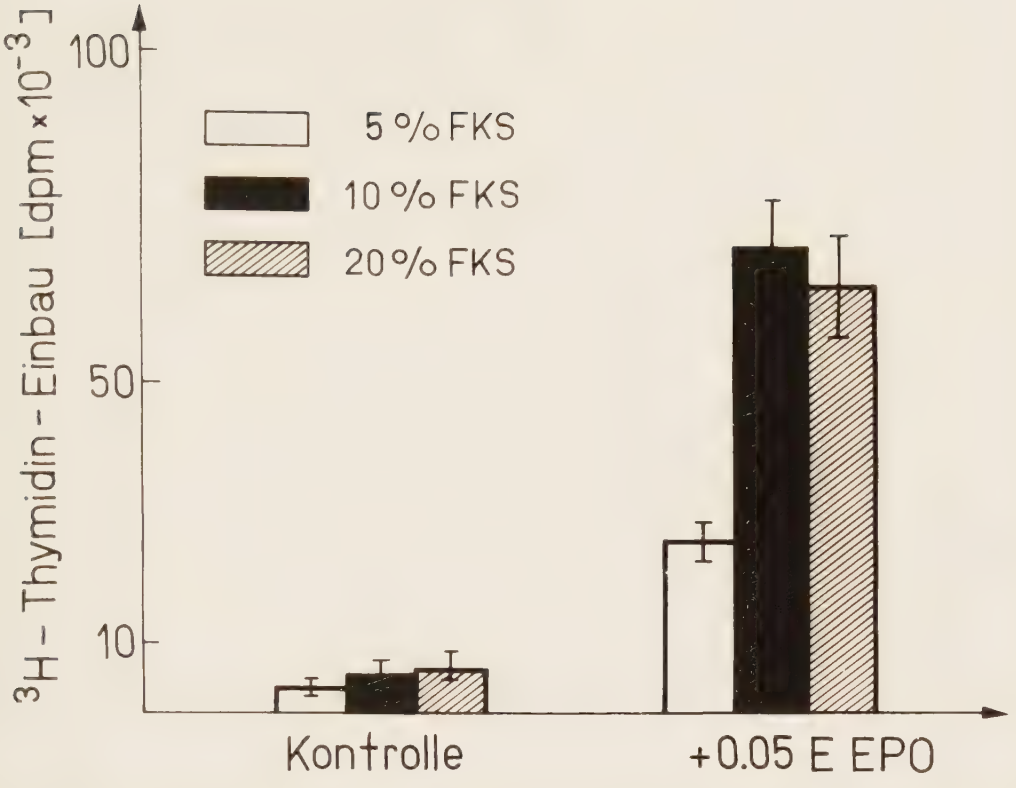

Abb. 8: Abhängigkeit des ^{3}H-TdR-Einbaus in fötale Mäuseleberzellen von der Serumkonzentration (fötales Kälberserum) im Kulturmedium (Die Werte repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichungen von 4 Parallelbestimmungen eines Experimentes).

Wie die Daten der Tabelle 5 belegen, ist die Zelldichte in der Kultur von entscheidender Bedeutung für die Leistungsfähigkeit der Methode. Der Stimulationseffekt einer bestimmten EPO-Dosis auf die DNS-Synthese fällt mit steigender Zellzahl stark ab, so daß bei Zellzahlen von mehr als 5×10^5 pro Kultur der Nachweis von EPO-Konzentrationen unterhalb 0,05 E unsicher wird (s. Abb. 9).

Eine weitergehende Herabsetzung der Zellzahl und damit verbundene Miniaturisierung und eventuelle Sensibilitätssteigerung war jedoch ohne grundsätzliche Veränderung der Versuchsmethode nicht möglich (s. 5.).

belle 5: Abhängigkeit der Erythropoietin-Wirkung von der Zellzahl pro Kultur
(Die Werte repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichungen von je 4 Parallelbestimmungen eines Experimentes; in den Klammern ist der Variabilitätskoeffizient angegeben)

ll- hl/ ltur	^{3}H-TdR-Einbau (dpm)																	
	EPO-Konzentration/Kultur																	
	Kontrollkultur				0,01 E				0,05 E				0,10 E				0,50 E			
	$\bar{x}$	±	s	(v)	$\bar{x}$	±	s	(v)	$\bar{x}$	±	s	(v)	$\bar{x}$	±	s	(v)	$\bar{x}$	±	s	(v)
10^7	11466	±	1020	(8,9%)	11392	±	1235	(10,8%)	13522	±	1455	(10,8%)	18209	±	2032	(11,2%)	23530	±	2170	(9,2%)
10^6	3800	±	241	(6,3%)	3141	±	518	(16,5%)	6462	±	575	(8,9%)	8250	±	978	(11,8%)	20327	±	1720	(8,4%)
10^5	3286	±	367	(11,2%)	7152	±	233	(3,2%)	18984	±	1271	(6,7%)	31160	±	2935	(9,4%)				

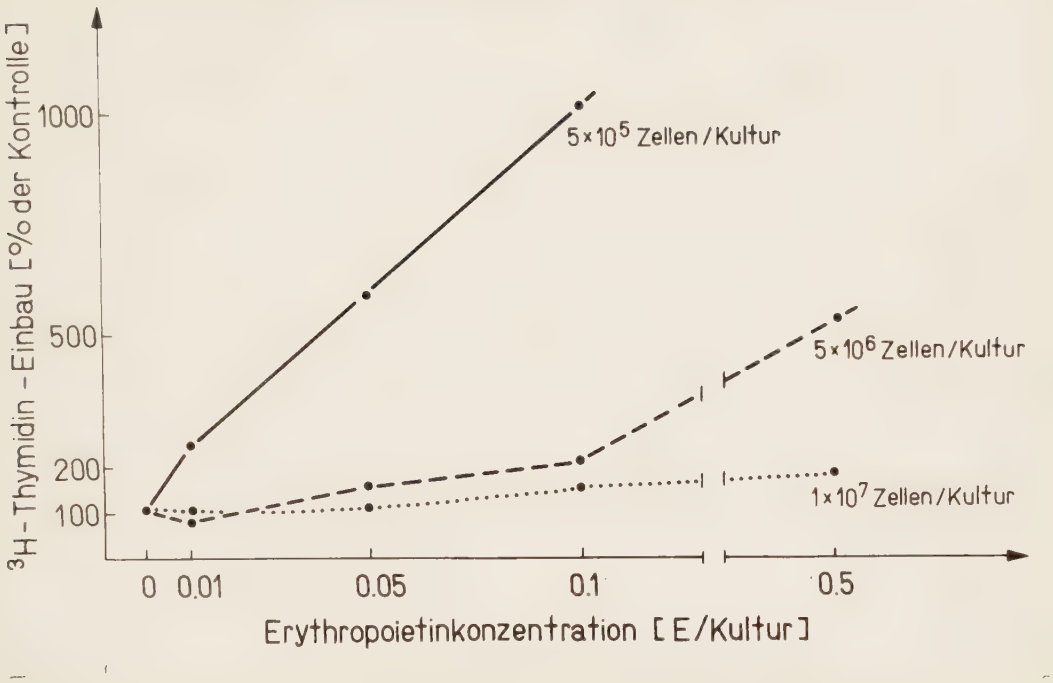

Abb. 9: Abhängigkeit der Erythropoietin-Wirkung von der Zellzahl pro Kultur
(Der ^{3}H-TdR-Einbau wurde am Ende der 24stündigen Inkubation in einer 4stündigen Markierungsperiode gemessen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte von je 4 Parallelbestimmungen.)

Um zu überprüfen, ob die EPO-Wirkung (und damit die Aktivität des verwendeten EPO-Standards) durch Frier-Tau-Behandlung beeinflußt wird, wurden vergleichende Untersuchungen mit einer einmal und viermal aufgetauten EPO-Standard-Präparation durchgeführt.
Wie der Tabelle 6 zu entnehmen ist, wurde kein Unterschied der stimulierenden Wirkung gefunden.
Trotzdem wurden auch die EPO-Standards in kleine Portionen aliquotiert und nur nach einmaligem Auftauen verwendet (s. 3.1.2.).

Tabelle 6: Vergleich der stimulierenden Wirkung einer ein- und viermal aufgetauten Erythropoietin-Standard-Präparation auf den ^{3}H-TdR-Einbau in fötale Mäuseleberzellen.
(Die Werte repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen eines Experimentes.)

EPO-Konzentration (E/Kultur)	Frier-Tau-Behandlung	^{3}H-TdR-Einbau (dpm) $\bar{x} \pm s$
0,05	1 x	18 984 $\pm$ 2 706
	4 x	17 792 $\pm$ 1 072
0,10	1 x	31 160 $\pm$ 2 642
	4 x	30 450 $\pm$ 2 963

4.2. Anwendung der Methode

4.2.1. Bestimmung der Erythropoese-stimulierenden Aktivität (ESA) menschlicher Plasmen

Aus der Korrelation der Proliferation erythroider Zellen mit der EPO-Dosis im Kulturmedium ergibt sich die Möglichkeit, die FMLZ-Kultur als in vitro-Bioassay für EPO bzw. ESA zu nutzen.
Mit ESA wird die stimulierende Wirkung von Testmaterialien (Plasmen) auf den ^{3}H-TdR-Einbau von FMLZ bezeichnet. Dabei wird die ESA einer Testsubstanz durch einen Vergleich der stimulierenden Wirkung der Testsubstanz mit der des EPO-Standards bestimmt.

Für das anämische Mäuseplasma war dies - wie die nahezu identischen Dosis-Wirkungs-Kurven belegen - problemlos möglich (s. Abb. 7).
Demgegenüber zeigten menschliche Plasmen bei der Untersuchung in der FMLZ-Kultur eine ausgeprägte „Toxizität". Sie drückte sich darin aus, daß die Dosis-Wirkungs-Kurven schon bei mittleren Konzentrationen wieder abfielen - was durch die Wirkung wachstumshemmender Faktoren erklärt werden kann - und sich als Resultanten sich überlagernder Prozesse von Stimulierung und Hemmung darstellten.
Wie der Abb. 10 zu entnehmen ist, konnte durch Inaktivierung des Plasmas (30 min 56° C) diese „Toxizität" partiell aufgehoben werden. Eine analoge Behandlung des EPO-Standards hatte keinerlei Einfluß auf die Lage seiner Dosis-Wirkungs-Kurve.

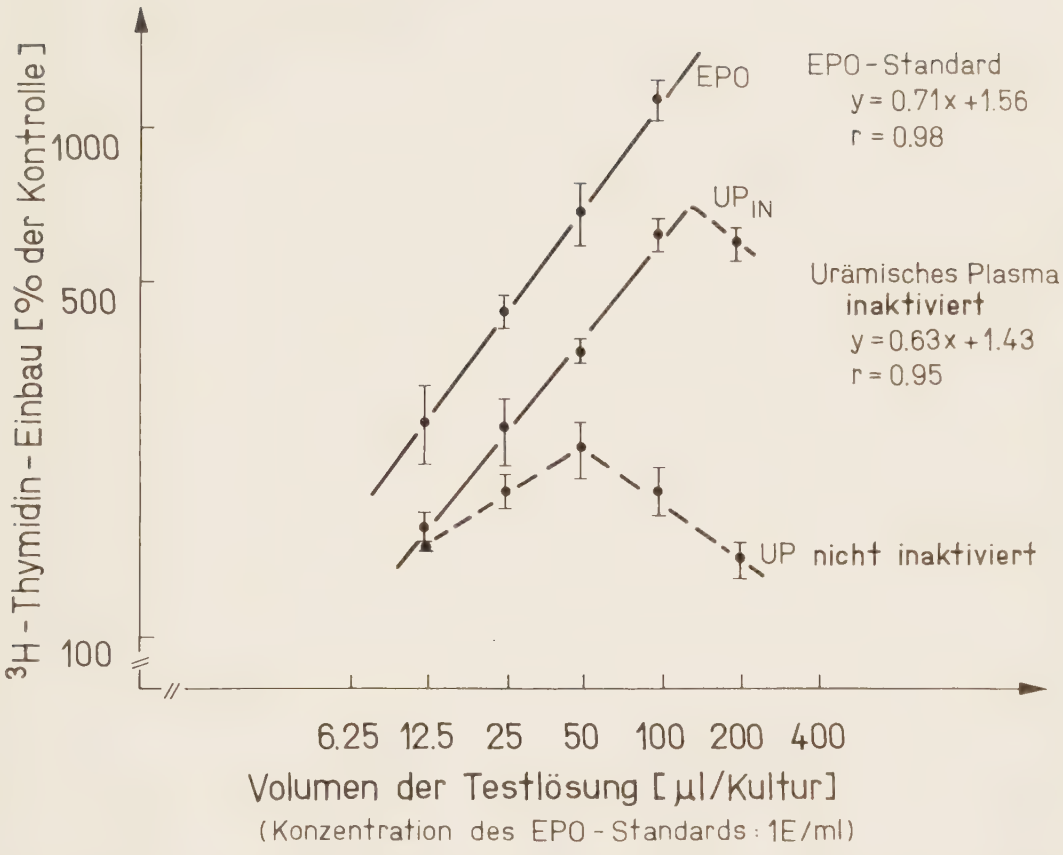

Abb. 10: Stimulierung des ^{3}H-TdR-Einbaus in fötale Mäuseleberzellen durch Humanplasma: Einfluß der Hitzeinaktivierung (30 min, 56° C)
(Der ^{3}H-TdR-Einbau wurde am Ende der 24stündigen Inkubation in einer 4stündigen Markierungsperiode gemessen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von je 4 Parallelbestimmungen.)

Die Testergebnisse zeigten, daß die unter diesen Bedingungen bestimmten Dosis-Wirkungs-Kurven ausreichend parallele lineare Bezirke aufwiesen, aus deren Abstand zur Kurve des EPO-Standards (gemessen auf der x-Achse, s. Abb. 11 - 14) ESA-Titer der Plasmen ermittelt werden konnten. Die bestimmten Werte wurden im Hinblick auf die Komplexität der im Plasma enthaltenen (stimulierenden und hemmenden) Faktoren in ESA-Einheiten angegeben, die den Werten des EPO-Standards zwar quantitativ, aber nicht qualitativ entsprechen.

Die Abbildungen 11 - 14 zeigen typische Dosis-Wirkungskurven, die mit Normalplasma, mit urämischem Plasma und mit gepoolten Plasmen von Patienten mit aplastischer Anämie bzw. Polyzythämia vera erhalten wurden.

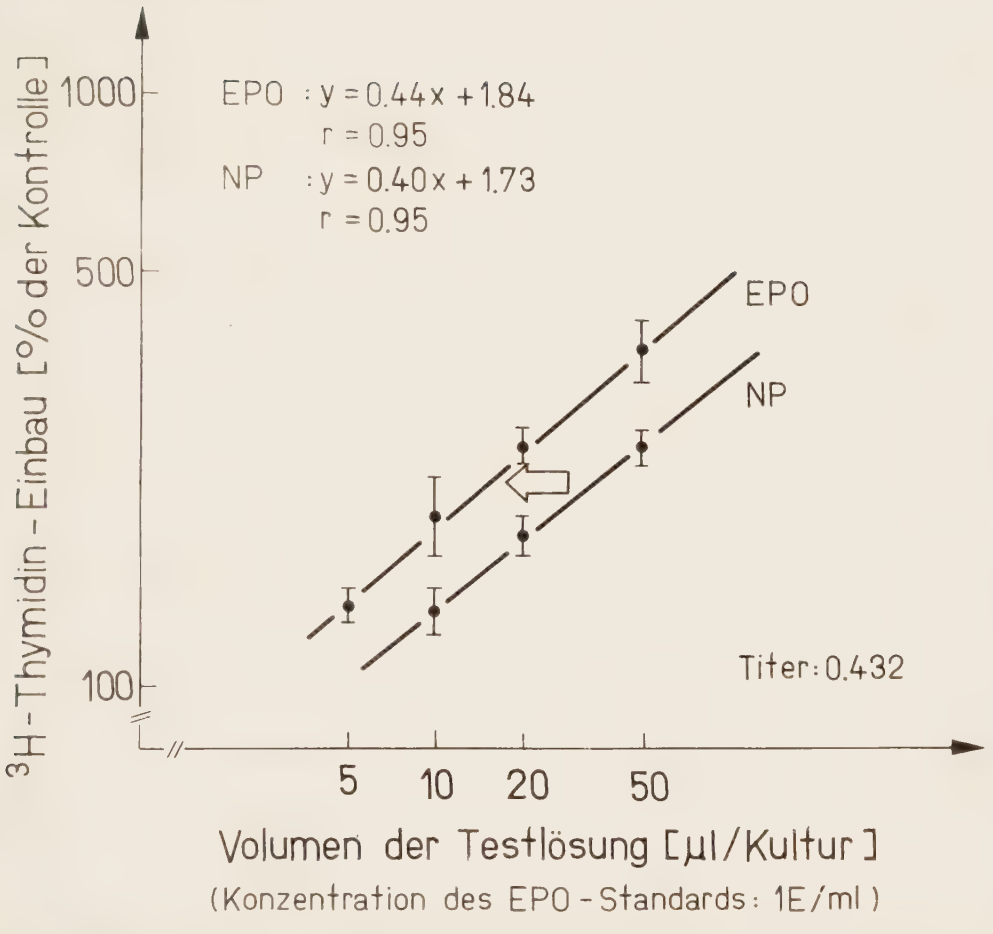

Abb. 11: Vergleich der Wirkungen von Erythropoietin und Normalplasma (NP) auf den ^{3}H-Thymidin-Einbau in fötale Mäuseleberzellen in vitro: Log Dosis-log Wirkungs-Kurven
(Der ^{3}H-TdR-Einbau wurde am Ende der 24stündigen Inkubation in einer 4stündigen Markierungsperiode gemessen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von je 4 Parallelbestimmungen.)

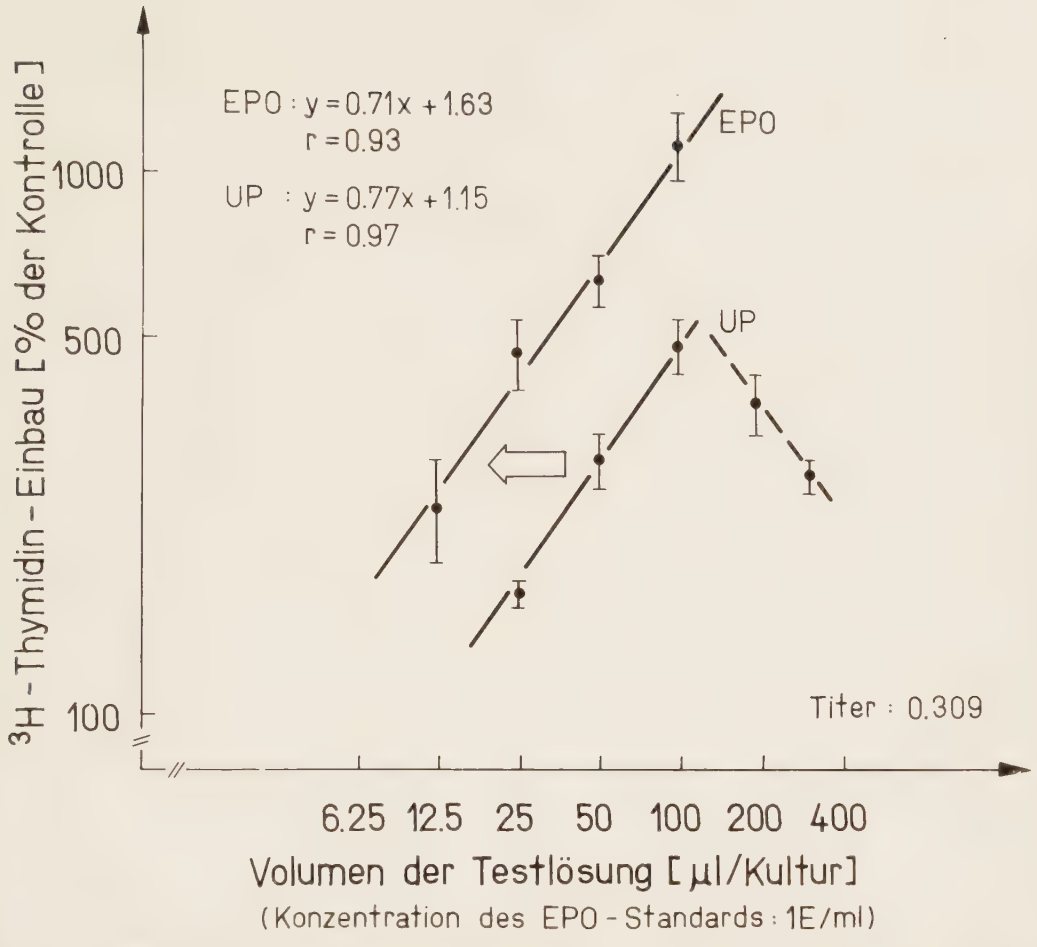

Abb. 12: Vergleich der Wirkungen von Erythropoietin und urämischem Plasma (UP) auf den ^{3}H-Thymidin-Einbau in fötale Mäuseleberzellen in vitro:
Log Dosis-log Wirkungs-Kurven
(Der ^{3}TdR-Einbau wurde am Ende der 24stündigen Inkubation in einer 4stündigen Markierungsperiode gemessen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von je 4 Parallelbestimmungen.)

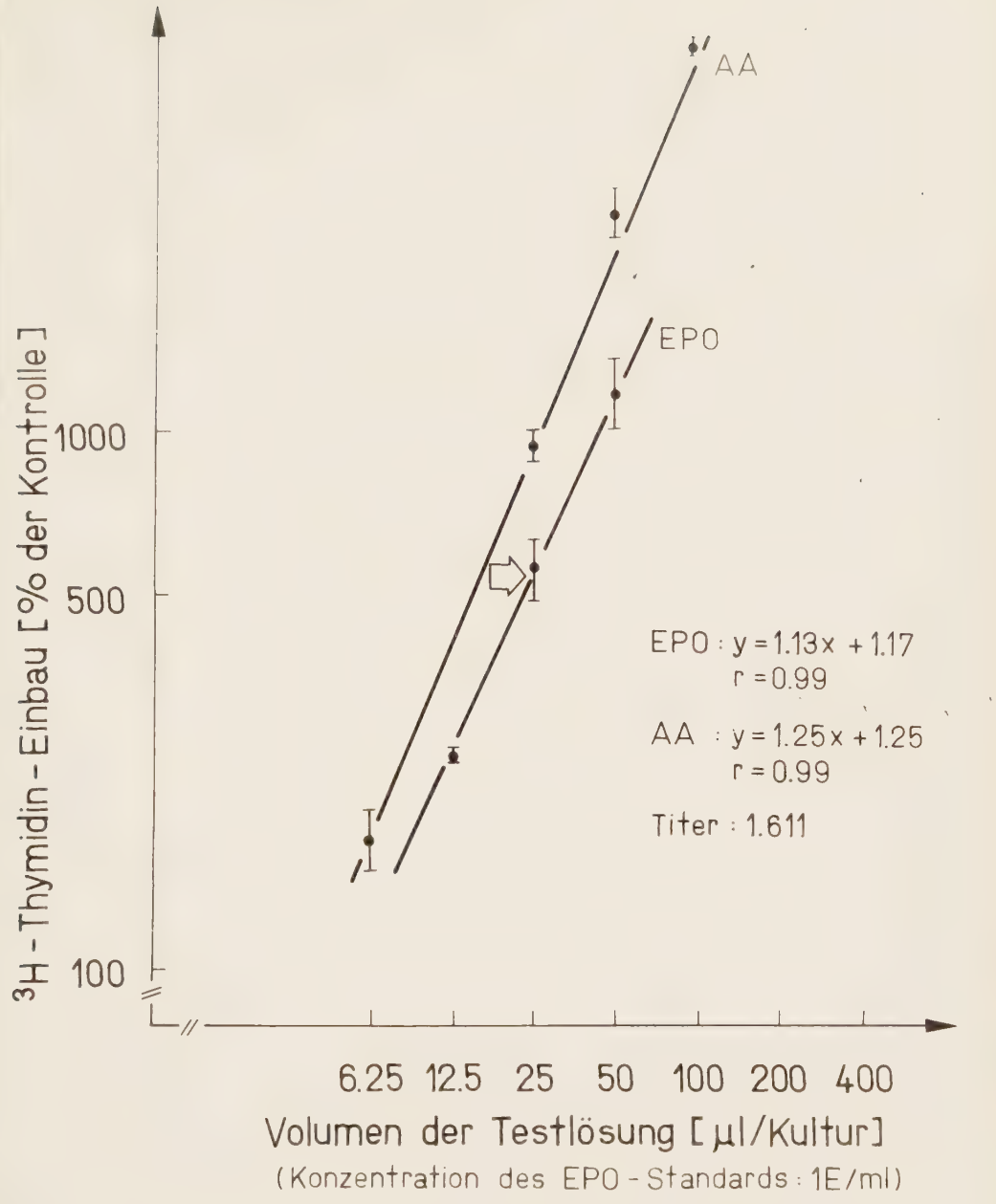

Abb. 13: Vergleich der Wirkungen von Erythropoietin und gepooltem (n = 2) Plasma von Patienten mit aplastischer Anämie (AA) auf den ^{3}H-Thymidin-Einbau in fötale Mäuseleberzellen in vitro:
Log Dosis-log Wirkungs-Kurven
(Der ^{3}H-TdR-Einbau wurde am Ende der 24stündigen Inkubation in einer 4stündigen Markierungsperiode gemessen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von je 4 Parallelbestimmungen.)

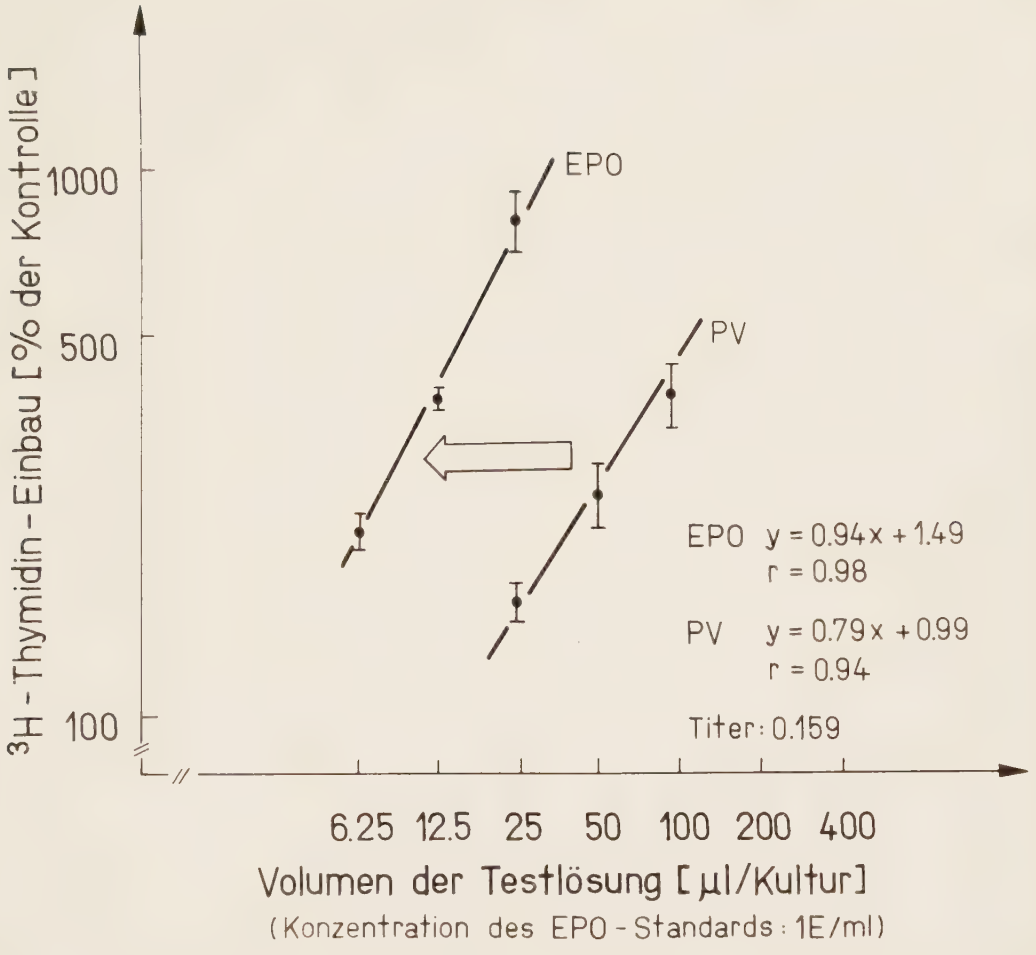

Abb. 14: Vergleich der Wirkungen von Erythropoietin und gepooltem (n = 3) Plasma von Patienten mit Polyzythämia vera (PV) auf den ^{3}H-Thymidin-Einbau in fötale Mäuseleberzellen in vitro:
Log Dosis-log Wirkungs-Kurven
(Der ^{3}TdR-Einbau wurde am Ende der 24stündigen Inkubation in einer 4stündigen Markierungsperiode gemessen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen von je 4 Parallelbestimmungen.)

Die Erythropoese-stimulierende Aktivität im Plasma von Normalpersonen, Kindern im chronischen Hämodialyseprogramm und Patienten mit ausgewählten hämatologischen Erkrankungen wurde mittels eines Computerprogramms für Parallelen-Bioassays (s. 3.2.2. und 8.) bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Erythropoese-stimulierende Aktivität im Plasma von Normalpersonen, Kindern im chronischen Hämodialyseprogramm und Patienten mit ausgewählten hämatologischen Erkrankungen

Art des Plasmas	Erythropoese-stimulierende Aktivität (E ESA/ml)
normal	
J.G.	0,43
M.S.	0,75
Pool (n = 10)	0,55
urämisch	
M.Z.	0,24
K.G.	0,31
D.K.	0,33
T.W.	0,42
U.B.	0,45
L.E.	0,63
S.H.	0,63
A.K.	0,72
Aplastische Anämie	
Pool (n = 2)	1,61
Polyzythämia vera	
Pool (n = 3)	0,16

Die ESA-Werte im Plasma von Kindern im chronischen Hämodialyseprogramm (s. Tabelle 7) wurden in Beziehung zum Hämatokrit-Wert gesetzt. Es ergab sich eine positive Korrelation beider Parameter (s. Abb. 15).

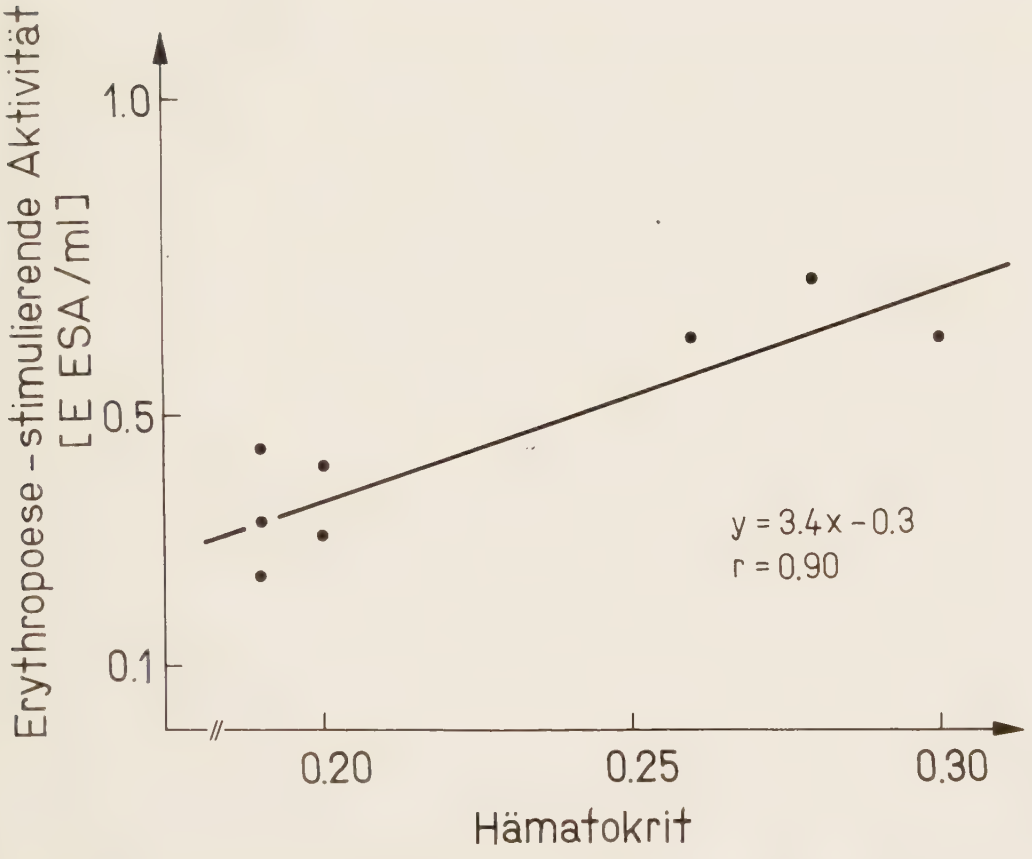

Abb.15: Hämatokrit und Erythropoese-stimulierende Aktivität im Plasma von terminal niereninsuffizienten Kindern

4.2.2. Die fötale Mäuseleberzell-Kultur als in vitro-Testmodell für „Urämietoxine"

Neben der Anwendung der FMLZ-Kultur zum Nachweis und zur Bestimmung von ESA ist es möglich, die Methode auch zur Darstellung von Hemmstoffen der Erythropoese einzusetzen. Hierzu wurden jedoch, im Gegensatz zum Vorgehen beim Nachweis von ESA, durch EPO stimulierte Kulturen benutzt und der hemmende Effekt der zugesetzten Testsubstanzen auf die EPO-Wirkung bestimmt (s. 3.2.).

In der Tabelle 8 ist die unterschiedliche Wirkung von normalem und urämischem Plasma auf den absoluten ^{3}H-TdR-Einbau in FMLZ-Kulturen wie auch auf den Stimulationseffekt des EPO dargestellt. Während die hemmende Wirkung des urämischen Plasmas am Stimulationsfaktor eindeutig meßbar ist, sind die Einflüsse auf den ^{3}H-TdR-Einbau komplexer. Der Zusatz von Normalplasma bewirkt eine erhebliche Steigerung des ^{3}H-TdR-Einbaus sowohl in EPO-stimulierte wie unstimulierte Kulturen. Der Effekt ist synergistisch, wie ein Vergleich der entsprechenden Versuchsgruppen (B, C und D) ergibt (vgl. auch Abb. 17).
Die Effekte von EPO und urämischem Plasma sind demgegenüber nicht einmal additiv (Versuchsgruppen B, E und F). Diese zur EPO-Wirkung antagonistischen Effekte von gepoolten urämischen Plasmen konnten auch mit Einzelplasmen von Hämodialysekindern vielfach reproduziert werden. Die Ergebnisse sind in der Abb. 16 dargestellt. In allen Fällen war durch das urämische Plasma eine signifikant geringere Stimulierung der FMLZ-Proliferation nachzuweisen, als durch Normalplasma erreicht wurde. In allen Versuchen wurde dasselbe aus hämatologischer und nephrologischer Sicht normale gepo lte Human-Plasma benutzt.

Tabelle 8: Vergleich des Effektes von Normal-Plasma (NP) und Urämie-Plasma (UP) auf die Stimulierung des ^{3}H-TdR-Einbaus in fötale Mäuseleberzellen durch Erythropoietin (0,05 E)
(Es wurden gepoolte Plasmen von 10 Normalpersonen und 5 Hämodialysepatienten verwendet. Die Werte entsprechen Mittelwerten $\pm$ Standardabweichungen von je 4 Parallelbestimmungen. Der ^{3}H-TdR-Einbau in fötale Mäuseleberzellen wurde am Ende der 24stündigen Inkubation in einer 4stündigen Markierungsperiode gemessen.)

Versuchsgruppe	Kulturbedingungen Plasmazusatz	EPO	^{3}H-TdR-Einbau (dpm) $\bar{x} \pm s$	Stimulationsfaktor
A	-	-	4 424 $\pm$ 467	2.8
B		+	12 340 $\pm$ 1 486	
C	+ NP	-	17 964 $\pm$ 530	2.9
D		+	51 769 $\pm$ 2 619	
E	+ UP	-	14 493 $\pm$ 1 190	1.1
F		+	15 556 $\pm$ 1 872	

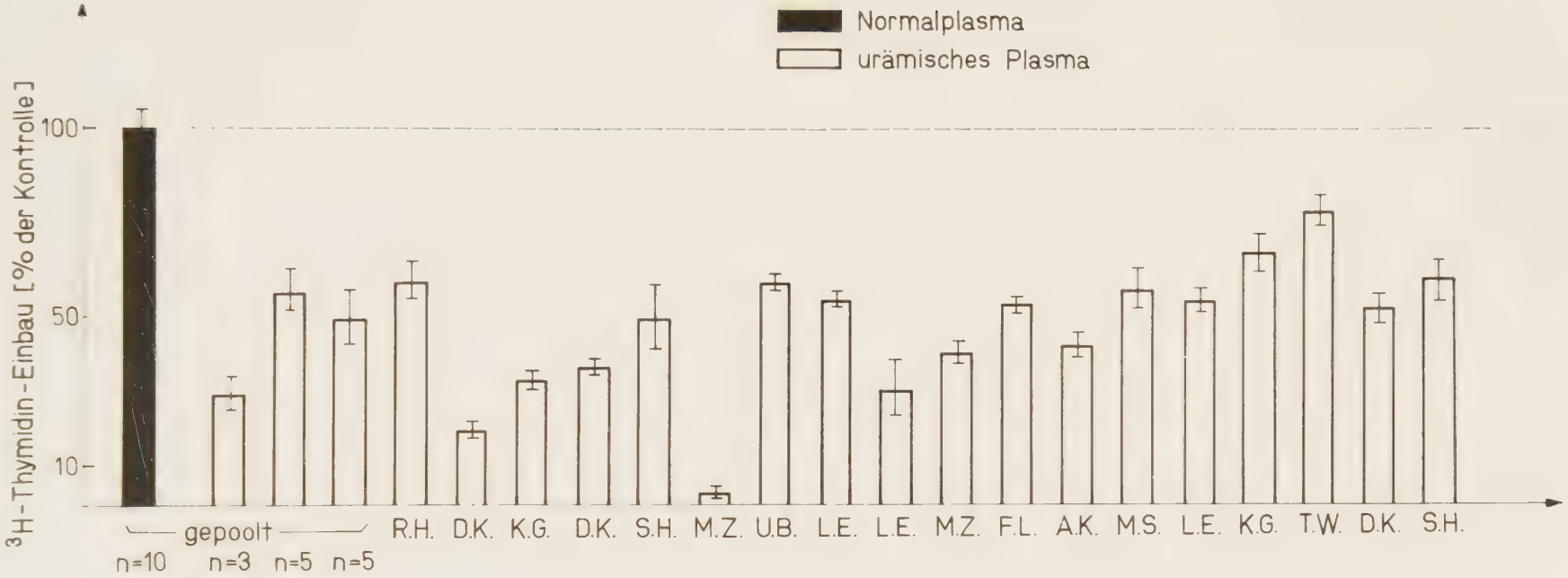

Abb. 16: Wirkung von urämischen Plasmen auf den ^{3}H-TdR-Einbau von Erythropoietin-(0,05 E)stimulierten FMLZ-Kulturen im Vergleich zu gepoolten Normal-Plasmen
(Um die aus verschiedenen Experimenten gewonnenen Ergebnisse vergleichen zu können, wurden der ^{3}H-TdR-Einbau bei Zusatz von Normal-Plasma gleich 100 % gesetzt. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen von je 4 Parallelbestimmungen. Der ^{3}H-TdR-Einbau wurde am Ende der 24stündigen Inkubation in einer 4stündigen Markierungsperiode gemessen.)

Um die Wirkung der hemmenden Substanzen, die sich im urämischen Plasma mit der stimulierender Faktoren überlagert, klar herauszuarbeiten, wurden durch Ultrafiltration (s. 3.3.) alle Stoffe mit einem Molekulargewicht größer als 20 000 Dalton und damit u.a. auch das EPO abgetrennt. Die Testung der so erhaltenen Ultrafiltrate zeigte bei urämischem Plasma eine deutliche Hemmung des durch EPO stimulierten ^{3}H-TdR-Einbaus (s. Abb. 17), während mit Ultrafiltrat von Normalplasma kein von den EPO-stimulierten Kontrollkulturen signifikant verschiedener Wert erhalten wurde.

Durch die Bestimmung der Gesamtzellzahl und des Anteils toter Zellen in den Kulturen vor und nach Inkubation wurde überprüft, ob die Hemmeffekte des urämischen Plasmas auf einer unspezifisch-toxischen Wirkung beruhen. Im Gegensatz zu EPO-stimulierten Kontrollkulturen, in denen eine ca. 50 %ige Zunahme der Zellzahl erfolgte (s. Abb. 3), blieb die Zellzahl in Gegenwart vom Ultrafiltrat urämischen Plasmas konstant (Proliferationshemmung). Der Anteil toter, Trypanblau-positiver Zellen war am Ende der Kultur unverändert.

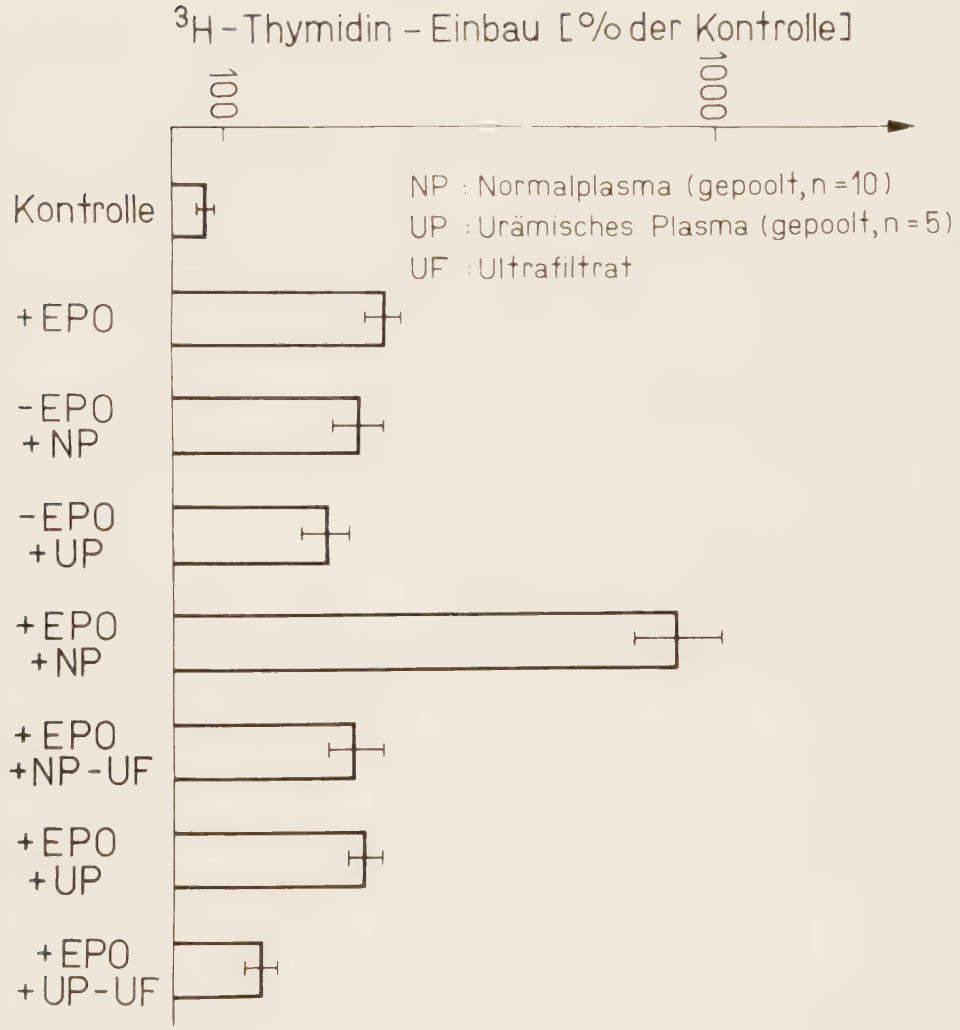

Abb. 17: Die Effekte von normalen und urämischen Plasmen sowie von deren Ultrafiltraten auf den ^{3}H-TdR-Einbau von Erythropoietin(0,05 E)-stimulierten FMLZ-Kulturen
(Der ^{3}H-TdR-Einbau wurde am Ende der 24stündigen Inkubation in einer 4stündigen Markierungsperiode gemessen. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von je 4 Parallelbestimmungen.)

Um zu überprüfen, ob die Hämodialyse einen Einfluß auf die Hemmwirkung des urämischen Plasmas auf die FMLZ-Proliferation hat, wurden Plasmen von acht Patienten vor und nach der Dialyse untersucht.
Obwohl mit 7 der 8 untersuchten Plasmen nach Dialyse eine stärkere Stimulierung des ^{3}H-TdR-Einbaus festgestellt wurde (s. Tabelle 9), war der Unterschied nur in einem Falle signifikant. Im Durchschnitt aller Versuche betrug der Einbau nach Dialyse 106 % der Ausgangswerte.

Tabelle 9: Vergleich der Wirkung von urämischem Plasma vor und nach Hämodialyse auf den ^{3}H-TdR-Einbau in Erythropoietin-stimulierte fötale Mäuseleberzellen
(Der ^{3}H-TdR-Einbau wurde am Ende der 24stündigen Inkubation in einer 4stündigen Markierungsperiode gemessen. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen von je 4 Parallelbestimmungen.)

Patient	^{3}H-TdR-Einbau (dpm), $x \pm s$		Verhältnis
	vor Dialyse	nach Dialyse	vor/nach Dialyse
R.H.	36 434 $\pm$ 3 879	39 514 $\pm$ 2 850	1.08 n.s.
K.G.	46 277 $\pm$ 4 449	56 775 $\pm$ 3 402	1.23 (t=0.05) s.
D.K.	53 034 $\pm$ 1 715	57 399 $\pm$ 605	1.08 n.s.
L.E.	51 890 $\pm$ 1 622	52 739 $\pm$ 8 280	1.02 n.s.
U.B.	62 434 $\pm$ 10 174	63 981 $\pm$ 6 191	1.02 n.s.
M.S.	25 283 $\pm$ 1 870	25 740 $\pm$ 1 233	1.02 n.s.
M.Z.	13 770 $\pm$ 980	12 954 $\pm$ 1 030	0.94 n.s.
S.H.	31 520 $\pm$ 1 945	33 806 $\pm$ 2 012	1.07 n.s.

5. Diskussion

Die Anämie ist eine der bedeutendsten Komplikationen von Patienten im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz, insbesondere von Kindern im chronischen Hämodialyseprogramm (s. 1.).
Die weitere Charakterisierung dieser renalen Anämie als Voraussetzung für das Auffinden kausaler Therapiemöglichkeiten bildet daher einen Schwerpunkt der Forschung.

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es, ein Testsystem zum Nachweis stimulierender und hemmender Faktoren der Erythropoese zu erarbeiten, um urämische Plasmen von Kindern im chronischen Hämodialyseprogramm hinsichtlich ihrer Erythropoese-stimulierenden Aktivität (Erythropoietin-Gehalt) als auch ihrer Hemmwirkung auf die Erythropoese („Urämietoxine") im Vergleich zu Normalplasma zu prüfen.
Das Testsystem sollte im Sinne dieser Zielstellung spezifisch sein, eine hohe Empfindlichkeit haben und mit relativ geringem Aufwand durchführbar sein.

Vielfach angewendetes Modell für die Erforschung erythropoetischer Prozesse ist das der polyzythämischen Maus (PZM). Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Unterdrückung der Eigenerythropoese der Versuchstiere durch Hypertransfusion von Erythrozyten und Messung der Erythropoese-stimulierenden Aktivität (Erythropoietin) von injiziertem Testmaterial anhand des ^{59}Fe-Einbaus in die peripheren roten Blutzellen (DAVIES et al., 1975; DE GOWIN et al., 1962; ESSERS et al., 1970; FISHER et al., 1968; KRZYMOWSKI et KRZYMOWSKA, 1962; LINDEMANN, 1971, 1973, 1975, 1976 a; MICHEL, 1981; MORIYAMA et al., 1970 a, b; PAVLOVIC-KENTERA et al., 1979; SCIGALLA et al., 1980 a, b, 1981).

Die Methode hat wesentlich zum Verständnis der Regulationsmechanismen der Erythropoese beigetragen. Ihre Anwendung ist jedoch erschwert durch die große Streuung der Ergebnisse. SCIGALLA (1981) gibt einen Variabilitätskoeffizienten von 21,2 % an. Die PZM-Methode ist zudem zeitaufwendig und vor allem nicht empfindlich genug, z.B. zur Bestimmung normaler Erythropoese-stimulierender Aktivitäten im Serum. Die untere erfaßbare Erythropoietinkonzentration beträgt 0,200 Einheiten (SCIGALLA, 1981).

Die Einführung einer in vitro Zellkultur durch KRANTZ und WARD war daher ein großer Schritt vorwärts, da Erythropoietin-Konzentrationen bis 50 Millieinheiten genau und reproduzierbar bestimmt werden konnten. Grundlage dieser in vitro Methode bildet der durch EPO stimulierte ^{59}Fe-Einbau in das Häm von Knochenmarkzellen (BRUNNER et al., 1976, 1978, 1979; GOLDWASSER et al., 1975 a; KRANTZ et al., 1963; MORIYAMA et al., 1974, 1975; WALLNER et al., 1976; WARD, 1967).

Die Empfindlichkeit konnte noch weiter erhöht werden (Nachweis von 5 Millieinheiten EPO) mit der von WARDLE beschriebenen fötalen Mäuseleberzellkultur (WARDLE et al., 1973).

Die FMLZ-Kultur - in den letzten Jahren in verschiedenen Laboratorien erprobt und diskutiert - war Grundlage unseres Testsystems und wurde im Sinne der Zielstellung der Arbeit modifiziert.

Werden FMLZ am 12. - 14. Gestationstag gewonnen, so erhält man eine relativ reine Suspension erythroider Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien (s. Tabelle 3), denn nicht-erythroide Prozesse, z.B. die Granulopoese, beginnen in der fötalen Mäuseleber erst mit dem 16. Gestationstag (RUGH, 1968).
Der im Vergleich zur heterogenen Knochenmarkkultur weitaus höhere Anteil EPO-sensibler erythroider Zellen in der FMLZ-Kultur bedingt auch die höhere Empfindlichkeit dieses Tests.

Wurden diese 12 - 14 Tage alten FMLZ in vitro in Gegenwart von Erythropoietin kultiviert, dann war nach anfänglichem Abfall eine erneute Stimulierung ihrer DNS-Synthese zu beobachten, während in den Kontrollkulturen ohne EPO der ^{3}H-TdR-Einbau innerhalb von 24 h kontinuierlich abfiel (s. Abb. 2).
Wie in der Abb. 3 dargestellt ist, kommt es in den unstimulierten Kulturen während der 24stündigen Inkubation zu einer Reifung der Zellen, wobei nur wenige Zellen absterben.
Dagegen findet in den EPO-stimulierten Kulturen neben dem Ausreifungsprozeß weiterhin eine Zellproliferation statt, so daß die Zellzahl um rund 50 % ansteigt. Dies beweist die proliferationsfördernde Wirkung des EPO auf die Erythroblasten und andere proliferationsfähige erythroide Zellen (FREDRICKSON et al., 1977; HEIDEMANN, 1980), während für den Ausreifungsprozeß EPO nicht essentiell ist (GRABER et al., 1978).

Die Abb. 2 zeigt deutlich, daß die EPO-Wirkung auf die DNS-Synthese nach etwa 12 h einsetzte und zwischen 20 - 24 h Inkubationszeit ein maximaler ^{3}H-TdR-Einbau, verglichen mit der Kontrollkultur, gemessen wurde.

Die Befunde stimmen mit den Beobachtungen von CHUI und FREDRICKSON überein, die einen Anstieg der DNS-Synthese durch EPO ebenfalls erst nach einer 10stündigen Inkubationszeit feststellen konnten (CHUI et al., 1971; FREDRICKSON et al., 1977).
Auch die Stimulierung der Hämoglobinsynthese durch EPO, gemessen am Einbau von ^{59}Fe in das Häm erythroider Zellen, trat sowohl in Knochenmarkkulturen (KRANTZ et al., 1963) als auch in FMLZ-Kulturen (FREDRICKSON et al., 1977) nach 10 - 12 h ein.

Wie die Abb. 2 zeigt, wurde auch in den ersten Inkubationsstunden bei EPO-stimulierten Kulturen ein höherer ^{3}H-TdR-Einbau als bei unstimulierten Kontrollkulturen gefunden.
Die Differenz zur Kontrollkultur war jedoch zu gering, als daß dieser „Soforteffekt" des EPO als Grundlage weiterer Untersuchungen geeignet schien.
Auch PAUL und HUNTER (1969) beschrieben eine Steigerung der DNS-Synthese bereits 1 h nach EPO-Gabe.
Dieser „Soforteffekt" des EPO auf den ^{3}H-TdR-Einbau könnte durch Beeinflussung von Transportprozessen an der Zellmembran erklärt werden und ist damit nicht Ausdruck einer erhöhten DNS-Synthese.

Die vom EPO-Gehalt in der Kultur unabhängigen hohen ^{3}H-TdR-Einbauraten zu Beginn der Kultivierung sind dadurch erklärbar, daß die Zellen bereits in vivo durch EPO-Einwirkung stimuliert wurden. Das geringe Ansteigen der DNS-Synthese nach 4stündiger Inkubation spiegelt wahrscheinlich die Erholung der Zellen nach der Präparationsprozedur wider, da der Anstieg sowohl für die Kontroll- als auch für die EPO-stimulierte Kultur zu beobachten ist.

Die Mehrzahl der Untersucher haben bei ihren Forschungen über die EPO-Wirkung den ^{59}Fe-Einbau in das Häm von erythroiden Zellen als Parameter der EPO-Wirkung benutzt (DUNN et al., 1978 a, b, 1979, 1981; KOCH et RADTKE, 1975; RADTKE et al., 1977, 1978 a, b, 1979; WARDLE et al., 1973). Die Messung der Stimulation der Häm-Synthese reflektiert spezifisch einen späten Schritt in der Reifung der roten Blutzellen.
Die meisten Studien über die EPO-Aktivität wurden somit an den späten Zelltypen in der Differenzierungsreihe der Erythropoese (s. 2.2.2.) gemacht.
Durch die Bestimmung des ^{3}H-TdR-Einbaus als Parameter der EPO-Wirkung wird die Aussage der Untersuchungen auf die Beeinflussung der Proliferation erythroider Zellen orientiert, wodurch eine breitere Palette von erythroiden Zellen erfaßt wird, nämlich auch jene frühen erythroiden Zellen, in denen noch keine Häm-Synthese stattfindet.

Vergleichende Untersuchungen über den ^{59}Fe-Einbau und den ^{3}H-TdR-Einbau in FMLZ wurden nur vereinzelt durchgeführt. FREDRICKSON et al. (1977) zeigten einen gleichartigen Verlauf von DNS-Synthese und Häm-Synthese von erythroiden Vorläuferzellen mit einem Maximum des EPO-Effektes nach 24stündiger Inkubation.
In einer Studie über die Wirkung von EPO auf den ^{59}Fe-Einbau in das Häm bzw. den Einbau von ^{3}H-TdR und ^{125}J-UdR in die DNS von FMLZ wurde die Vergleichbarkeit der Befunde, also eine Analogie der Meßparameter in ihrer Aussage nachgewiesen (BRANDAN et al., 1981 a, b). Die Autoren unterstreichen, daß die Stimulation der DNS-Synthese als spezifischer Index der EPO-Aktivität im fötalen Mäuseleberzellsystem benutzt werden kann und der ^{59}Fe-Einbau-Methode überlegen ist. Als Beweis führen sie die Testung zweier EPO-Präparationen von unterschiedlichem Reinigungsgrad (2 IE EPO/mg Protein und 1 300 IE EPO/mg Protein) an, die

identische Dosis-Wirkungs-Kurven lieferten. Durch eine vollständige Blockierung sowohl des ^{3}H-TdR-Einbaus als auch des ^{59}Fe-Einbaus nach einer Präinkubation des EPO mit einem Anti-EPO-Antiserum wurde die Wirkung zusätzlicher EPO-unabhängiger Stimulatoren auf die DNS-Synthese ausgeschlossen.

Die Messung des EPO-Effektes anhand des H-TdR-Einbaus hat mehrere Vorteile.

Für praktische Belange bedeutsam ist die im Vergleich zum energiereichen γ-Strahler ^{59}Fe wesentlich leichtere Handhabbarkeit des Radionuklids ^{3}H, so daß die Versuchsdurchführung nicht durch aufwendige Strahlenschutzmaßnahmen (Speziallabore) erschwert wird.

Ein weiterer Vorteil der Messung der DNS-Synthese als Parameter der EPO-Wirkung in der FMLZ-Kultur ist das günstigere Verhältnis der Meßwerte zwischen stimulierter und Kontrollkultur (8 : 1 bei Bestimmung eines bestimmten EPO-Effektes anhand des ^{3}H-TdR-Einbaus, 3 : 1 bei Messung des ^{59}Fe-Einbaus).

Der ^{3}H-TdR-Einbau fällt in den Kontrollkulturen nach 24stündiger Inkubationszeit auf eine niedrigere Basislinie ab als die basale Häm-Synthese. Erklärt wird dies mit dem kontinuierlichen Weiterreifen der roten Vorläuferzellen (s. Abb. 3) und einer damit persistierenden Häm-Synthese, so daß die Differenz zur EPO-Stimulation geringer wird (BRANDAN et al., 1981).

Nicht zuletzt bietet die Messung des ^{3}H-TdR-Einbaus große Vorteile gegenüber dem ^{59}Fe, wenn biologische Materialien hinsichtlich ihrer Erythropoese-stimulierenden Aktivität in der FMLZ-Kultur getestet werden. Es kann das als Indikator dienende Radionuklid ^{59}Fe durch den Eisengehalt des Plasmas, der in der FMLZ-Kultur mit dem radioaktiv markierten Eisen interferiert, verdünnt werden.

Bei Bestimmung des ^{3}H-TdR-Einbaus als Indikator für EPO- oder ESA-Wirkungen besteht diese Gefahr nicht, was z.B. auch dadurch belegt wird, daß die durch ein urämisches Plasma stimulierten Einbauraten (47 766 $\pm$ 2 266 dpm) nach Dialyse (zur Abtrennung eventuell vorkommenden kalten Thymidins) nicht signifikant verändert waren (49 759 $\pm$ 1 645 dpm).

Viele Autoren weisen darauf hin, daß wegen der variierenden Eisen-Transferrin-Konzentration in den verschiedenen Plasmen nicht kontrollierbare Unterschiede in der Effektivität des radioaktiv markierten Eisens unvermeidlich sind (DINKELAAR et al., 1981; DUNN et al., 1981 a; DE KLERK et al., 1978 a; RADTKE et al., 1978 a, b). Das Resultat ist ein falsch niedriger ^{59}Fe-Einbau. Die Untersucher geben zwar verschiedene Korrekturmöglichkeiten an, diese sind aber aufwendig und kompliziert (DINKELAAR et al., 1981; DE KLERK et al., 1978 a). In jüngsten Berichten wird daher zunehmend auf den ^{125}J-UdR-Einbau als Maß der EPO-Wirkung auf FMLZ orientiert (DUNN et al., 1981, 1983).

Die Höhe des EPO-stimulierten ^{3}H-TdR-Einbaus ist vom Verhältnis der gegebenen EPO-Dosis und der vorhandenen Zellzahl (s. Abb. 9) abhängig, was darauf schließen läßt, daß die Höhe des Effektes von der Intensität der Wechselwirkung mit spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche bestimmt wird.
Die Verwendung von 5 x 10^{5} Zellen pro Kultur (Volumen 1,2 ml) erwies sich als optimal und erlaubte den sicheren Nachweis von 0,005 E EPO.

Eine weitergehende Herabsetzung der Zellzahl und damit verbundene Empfindlichkeitssteigerung der Methode wäre nur durch eine grundsätzliche Änderung der Versuchsanordnung möglich (Ablösung der herkömmlichen Arbeit mit Zentrifugenröhrchen durch Mikrotiterplatten und Einsatz von sogenannten „Zellharvester"-Geräten, die nicht zur Verfügung standen).

Bei einer gegebenen Zellzahl pro Kultur ist die Höhe des ^{3}H-TdR-Einbaus von der EPO-Konzentration abhängig. Die entsprechenden Dosis-Wirkungs-Kurven zeigen den für biologische Systeme typischen exponentiellen Verlauf. Sie lassen sich nach logarithmischer Transformation durch lineare Gleichungen beschreiben, die durch hohe Korrelationskoeffizienten charakterisiert sind. Dadurch ist eine gute mathematische Auswertbarkeit der Kurven gegeben (s. Abb. 6).

Der Effekt des EPO konnte in allen Versuchen reproduziert werden. Trotz größtmöglicher Standardisierung der Versuchsbedingungen war jedoch - wie die Tabelle 4 zeigt - sowohl der ^{3}H-TdR-Einbau der unstimulierten Kontrollkultur als auch die stimulierende Wirkung des EPO in unterschiedlichen Versuchen verschieden hoch.
Diese interexperimentelle Variabilität wurde auch in der variierenden Lage der EPO-Dosis-Wirkungs-Kurven verschiedener Versuche deutlich (s. Abb. 6).
Die Ursache hierfür liegt vor allem im unterschiedlichen Alter (11 - 13 d) der verwendeten fötalen Mäuseleberzellen. Wie Untersuchungen von MARKS et al. (1972) zeigen, differiert die morphologische Klassifikation der FMLZ bereits bei einem Unterschied im Gestationsalter von 1 d erheblich. Dies wird durch die Streuung im Anteil der einzelnen erythroiden Zelltypen nach Differenzierung von 10 verschiedenen Ausstrichen bestätigt (s. Tabelle 3).

Aus diesen Schwankungen in der Zusammensetzung der benutzten FMLZ-Präparation resultieren Unterschiede sowohl in der Zahl der EPO-sensiblen Zellen (quantitativ) als auch im Empfindlichkeitsgrad (qualitativ), da die verschiedenen Reifestufen der erythroiden Vorläuferzellen gegenüber EPO unterschiedlich stark sensibel sind (s. 2.2.2.).
Es wurden die Effekte auf die Kontrollen (= 100 %) normiert, um in unterschiedlichen Experimenten erhaltene Ergebnisse vergleichbar zu machen.
In jedem Versuch wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve eines EPO-Standards mitbestimmt.

Im Gegensatz zu den interexperimentellen Unterschieden war die intraexperimentelle Variabilität, d.h. die Streuung der zu einem Konzentrationswert durchgeführten Parallelbestimmungen, mit durchschnittlich < 10 % gering.

Um Aussagen über die Erythropoese-stimulierende Aktivität menschlicher Plasmen zu erhalten, wurden diese in unterschiedlichen Konzentrationen anstelle des EPO-Standards zu den FMLZ-Kulturen gegeben. Es zeigte sich, daß auch menschliche Plasmen in der Lage sind, den ^{3}H-TdR-Einbau in die FMLZ zu stimulieren, also eine dem EPO vergleichbare Erythropoese-stimulierende Aktivität besitzen.
Die Dosis-Wirkungs-Kurven der Plasmen zeigten jedoch flachere, zur EPO-Standardkurve nicht parallel abweichende Verläufe (s. Abb. 10). Nach Inaktivierung der Plasmen vor Versuchsbeginn (30 min, 56° C) wurden höhere ^{3}H-TdR-Einbauraten gemessen, und die Dosis-Wirkungs-Kurven verliefen zumindest bei niedrigen Plasmakonzentrationen annähernd parallel zur Standardkurve (s. Abb. 10).

Analoge Befunde wurden von RADTKE (1978) beschrieben, jedoch bei Messung des ^{59}Fe-Einbaus in das Häm von FMLZ. V. PREYSS et al. (1976) diskutierten immunologische Faktoren als Ursache für die „Toxizität" menschlicher Plasmen in der FMLZ-Kultur und halten es für wahrscheinlich, daß durch Interaktion zwischen Antikörpern und Komplement eine Zytolyse von FMLZ bewirkt wird.
Durch Inaktivierung bei 56° C konnte die Toxizität durch Zerstörung des hitzelabilen Teils des Komplementes beseitigt werden (V. PREYSS et al., 1976).

In der vorliegenden Arbeit wurden daher alle Plasmen vor der Untersuchung hitzeinaktiviert. Eine Inaktivierung des EPO-Standards hatte keinerlei Einfluß auf die Lage seiner Dosis-Wirkungs-Kurve.
Die „Toxizität" menschlicher Plasmen in der FMLZ-Kultur, die sich in einer Hemmung des ^{3}H-TdR-Einbaus mit zunehmender Plasmakonzentration in der Kultur ausdrückt, ist jedoch nicht nur auf komplementabhängige Antikörper, die durch Hitzeinaktivierung beseitigt werden können, zurückzuführen.
Bei Konzentrationen von mehr als 50 - 100 µl Humanplasma pro Kulturansatz (> 5 - 10 %) bewirkten alle untersuchten urämischen und Normal-Plasmen auch nach Inaktivierung ein Wiederabfallen der Dosis-Wirkungs-Kurven.
In niederen Konzentrationsbereichen ergaben sich jedoch lineare und zur EPO-Standardkurve parallele Bereiche (s. Abb. 10 - 14), die eine eindeutige Bestimmung der im Testplasma enthaltenen Erythropoese-stimulierenden Aktivität ermöglichten.

Die Linearität und Parallelität der Dosis-Wirkungs-Kurven von Standard und Testmaterial sind Voraussetzung für die Konzentrationsbestimmung einer Substanz im Bioassay (DUNN et al., 1978).
Der lineare Zusammenhang zwischen der Konzentration der getesteten Humanplasmen und dem ^{3}H-TdR-Einbau in FMLZ wurde durch hohe lineare Korrelationskoeffizienten der log Dosis-log Wirkungs-Kurven bewiesen (s. Abb. 10 - 14). Um zu sichern, daß drei aufeinanderfolgende Werte der Kurven im linearen Bereich lagen, wurden mindestens fünf Plasmakonzentrationen untersucht. Ein Ein-Dosis-Test kann zu Fehlbestimmungen führen, weil bei der Testung von nur einer Konzentration nicht zwischen aufsteigendem und wieder abfallendem Schenkel der Dosis-Wirkungs-Kurve unterschieden werden kann (s. Abb. 12). Es sei auf das Beispiel des Polyzythämischen Mäuseassays verwiesen, der aus Gründen der Versuchsbegrenzung nur auf der Ein-Dosis-Basis benutzt wird. DUNN (1978) demonstrierte einen Unterschied in der Erythropoietin-Bestimmung ein und desselben Serums zwischen 0,025 und 0,500 E/ml (!) in Abhängigkeit von der Menge des injizierten Serums und hält die Methode daher für ungeeignet.
Das zweite Kriterium für die Anwendbarkeit der FMLZ-Kultur als in vitro-Bioassay für die Bestimmung Erythropoese-stimulierender Effekte ist die Parallelität zwischen den Dosis-Wirkungs-Kurven des EPO-Standards und des Testmaterials, denn nur dann kann angenommen werden, daß eine biologische und pharmakologische Gleichartigkeit der Wirkung von Standard und Testsubstanz vorliegt (DUNN et al., 1978). Diese Parallelität konnte bei allen untersuchten Plasmen bestätigt werden (s. 8.).

Aus dem Abstand der Regressionsgeraden von EPO-Standard und Testmaterial kann eine quantitative Aussage über die Erythropoese-stimulierende Aktivität des Testmaterials (Plasma) im Vergleich zum EPO-Standard gemacht werden (s. Abb. 11 - 14, s. Tabelle 7).

Es ist jedoch unklar, ob diese Aktivität mit dem Erythropoietin-Gehalt im Plasma gleichzusetzen ist oder ob im Plasma weitere Substanzen enthalten sind, die unspezifisch die DNS-Synthese, also den ^{3}H-TdR-Einbau stimulieren, so daß der durch das Plasma bewirkte Effekt nicht allein auf Erythropoietin zurückzuführen ist.
BILLAT et al. (1982) beschreiben zum Beispiel einen stimulierenden Einfluß geringer Konzentrationen von Glukokortikoiden auf die erythroide Koloniebildung (CFU-E) von fötalen Leberzellen.
BRANDAN et al. (1981 b) und DUNN et al. (1983) fanden, daß Transferrin den Effekt von EPO bei der Stimulierung des ^{3}H-TdR-Einbaus bzw. ^{125}J-UdR in die DNS der FMLZ erhöht. BRANDAN bewies, daß dieser Effekt des Transferrins fest an die EPO-Wirkung gekoppelt ist, da er durch EPO-Antiseren blockiert werden konnte.
Die eigenen Ergebnisse (s. Tabelle 8) weisen auf synergistische Beeinflussungen der EPO-Wirkung durch Plasmafaktoren hin, wie sie auch für Wachstumsfaktoren bekannt sind (ROSENGURT, 1980). Diese Befunde widersprechen aber denen von NAPIER et al. (1977), die extra darauf hinweisen, daß sie keinen Beweis eines solchen interaktiven Prozesses zwischen EPO und Serum führen konnten.
Die synergistische Wirkung von EPO und Normalplasma auf den ^{3}H-TdR-Einbau der FMLZ scheint im Widerspruch zu stehen zu den Befunden, die bei der Bestimmung des optimalen Anteils an fötalem Kälberserum (FKS) im Kulturmedium erhalten wurden (s. Abb. 8).
Hier bewirkte die Erhöhung des FKS-Anteils von 10 auf 20 % keine weitere Steigerung der DNS-Synthese. Die Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, daß im FKS kaum EPO oder andere ESA enthalten sind (EPO-Konzentration: < 6 m E/ml (KRYSTAL, 1983)), die stimulierende Wirkung anderer Wachstumsfaktoren in der FMLZ-Kultur dagegen bei einem Gehalt von 10 % bereits voll entfaltet ist.

Das Hormon Erythropoietin fungiert als Hauptregulator der Erythropoese. Seine Wirkung wird in vivo durch weitere Serumfaktoren modifiziert (HEIDEMANN, 1980).
Bei Testung von Seren oder Plasmen in vitro kann der Einfluß derartiger Faktoren auf die Proliferation erythroider Zellen nicht von der eigentlichen EPO-Wirkung unterschieden werden. Die Gesamtaktivität eines Serums oder Plasmas wird daher nicht in „Einheiten EPO", sondern in „Einheiten ESA" (Erythropoese-stimulierende Aktivität) angegeben.

Um die Spezifik der Methode für Erythropoietin zu erhöhen, haben einige Untersucher anstelle von Plasma durch Hitze- und Säurebehandlung hergestellte proteinarme Serumkonzentrate getestet (DUNN et NAPIER, 1981; DUNN et DAVIDSON, 1981, NAPIER et JANOWSKA-WIECZOREK, 1981 a). Dabei fanden sich recht unterschiedliche Ergebnisse, die sowohl in einem Anstieg als auch in einer Verringerung der DNS-Synthese bestanden.
BRANDAN et al. (1981) zeigten, daß durch die Serumkonzentrierung bis zu 61 % (!) des immunreaktiven EPO verloren gehen kann.

Tabelle 10: Erythropoietinbestimmungen mit verschiedenen Methoden

Methode	Indikator	Art des Testplasmas	EPO-bzw.ESA-Titer (E/ml)	Autor
PZM	^{59}Fe	Normalplasma	0.32 ± 0.28	DAVIES et al. (1975)
		Urämisches Plasma	0.34 ± 0.28	DAVIES et al. (1975)
			0.13 ± 0.02	SCIGALLA et al. (1981)
		Aplastische Anämie	0.60 - 4.28	PAVLOVIC-KENTERA et al. (1979)
FMLZ	^{59}Fe	Normalplasma	0.15 ± 0.10	NAPIER et DUNN (1977)
			0.14 - 0.70	RADTKE et al. (1978 a)
			0.06 - 1.70	DUNN et NAPIER (1978 b)
			0.36 ± 0.06 (0.00 - 1.20)	DUNN et GIPSON (1983)
		Urämisches Plasma	0.01 - 0.04	MÜLLER-WIEFEL (1981 a, b)
			0.02 - 0.39	RADTKE et al. (1978 a)
			0.21 - 0.67	KOCH et RADTKE (1979)
		Aplastische Anämie	47.8	DUNN et NAPIER (1978 b)
			0.24	MÜLLER-WIEFEL (1981 a, b)
	^{125}J-UdR	Normalplasma	0.29 ± 0.04 (0.00 - 0.93)	DUNN et GIPSON (1983)
			0.003 - 0.02	NAPIER et JANOWSKA-WIECZOREK (1981)
		Polyzythämia vera	0.001	NAPIER et JANOWSKA-WIECZOREK

Methode	Indikator	Art des Test-plasmas	EPO-bzw.ESA-Titer (E/ml)	Autor
FMLZ	^{3}H-Uridin	Normalplasma	2.12 ± 0.84	BESSLER et al (1980)
		Urämisches Plasma	2.27 ± 1.27	BESSLER et al (1980)
		Aplastische Anämie	6.93 ± 1.03	BESSLER et al (1980)
		Polyzythämia vera	1.07 ± 0.25	BESSLER et al (1980)
	^{3}H-TdR	Normalplasma	0.43 - 0.75	eigene Ergebnisse
		Urämisches Plasma	0.24 - 0.72	eigene Ergebnisse
		Aplastische Anämie	1.61	eigene Ergebnisse
		Polyzythämia vera	0.16	eigene Ergebnisse
RIA		Normalplasma	0.018 ± 0.005	MILLER et al. (1981)
			0.018 ± 0.081	ZAROULIS et al. (1981)
			0.021 ± 0.023	GARCIA et al. (1979)
			0.023 ± 0.001	Mc GONIGLE et al. (1984)
		Urämisches Plasma	0.032 ± 0.002	Mc GONIGLE et al. (1984)
		Aplastische Anämie	0.984 - 6.434	ZAROULIS et al. (1981)
		Polyzythämia vera	0.018	ZAROULIS et al. (1981)

Wie die in Tabelle 10 zusammengestellten Daten ausweisen, gibt es große Differenzen in den Angaben über die EPO-Spiegel in Plasmen unterschiedlicher Herkunft.
Diese Differenzen sind ein Beleg dafür, daß die Erythropoese-stimulierende Aktivität (ESA) in biologischen Materialien wie Plasma oder Serum nicht allein durch EPO, sondern durch weitere, zum EPO eventuell synergistisch wirkende Faktoren bestimmt wird.

Auffallend sind die niedrigen EPO-Konzentrationen, die bei Anwendung von Radioimmunassays (RIA) (GARCIA et al., 1979; Mc GONIGLE et al., 1984; MILLER et al., 1981; ZAROULIS et al., 1981) bestimmt werden.
Obwohl ein RIA die empfindlichste und sehr spezifische Methode zur EPO-Bestimmung ist, gab es bisher Schwierigkeiten bei der Entwicklung dieser Tests, weil hinreichend gereinigte EPO-Präparationen zur Gewinnung von Antikörpern gegen EPO als Grundlage der RIAs nur schwer zugänglich waren.
Mit Hilfe moderner Methoden der Gen- und Immuntechnik wird aber künftig sowohl die Produktion von EPO (LEE-HUANG et al., 1984) wie auch die Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen EPO (YANAGAWA et al., 1984) in großen Mengen möglich sein.
Die Ergebnisse der in vivo- und in vitro-Bioassays sind miteinander vergleichbarer.
Eine wesentliche Ursache für die bestehenden Differenzen liegt darin, daß z.B. Asialo-EPO, ein EPO ohne die endständige Sialinsäure, in vivo keine Wirkung hat, da das Asialo-EPO sehr schnell durch die Leber abgebaut wird, beruhend auf einer spezifischen Wechselwirkung zwischen dem freigesetzten Galaktose-Rest des Asialo-EPO und den Leberzellen, während es in vitro voll aktiv ist (GOLDWASSER et al., 1976; GRABER et al., 1978).

Die Äquivalenz der Aussagen, die z.B. mit ^{59}Fe in vivo und ^{3}H-TdR- oder ^{125}J-UdR in vitro erhalten werden, ist bisher nicht systematisch geprüft worden.
Auf die mögliche Verfälschung der mit ^{59}Fe bestimmten Werte durch das im Plasma enthaltene unmarkierte Eisen wurde bereits hingewiesen.
Bei Ausschluß dieser Fehlerquelle besteht jedoch nach DUNN et al., (1983) eine signifikante Korrelation zwischen den aus ^{59}Fe- und ^{125}J-UdR-Einbau bestimmten EPO-Werten. Unterschiede in der Höhe der ESA-Werte, die bei urämischen (und Normal-) Plasmen erstmals anhand der Beeinflussung des ^{3}H-TdR-Einbaus in FMLZ-Kulturen bestimmt wurden, und denen, die mit der ^{59}Fe-FMLZ- bzw. ^{59}-Fe-PZM-Methode erhalten wurden, können darauf zurückgeführt werden, daß Proliferation (^{3}H-TdR-Einbau) und Differenzierung (^{59}Fe-Einbau) erythroider Zellen durch die im urämischen (und Normal-) Plasma enthaltenen Wirkstoffe unterschiedlich beeinflußt werden.
Die Parallelität der mit EPO-Standards und Plasmen als Quelle von ESA erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven macht jedoch den Einfluß EPO-unabhängiger Faktoren unwahrscheinlich (DUNN et al., 1983).

Ein großes Problem scheint auch in der Vergleichbarkeit der von verschiedenen Untersuchern benutzten EPO-Standardpräparation zu liegen, die als Grundlage für die bestimmten EPO-Titer in Plasmen dienten.
Die erste Referenzpräparation des Erythropoietins stand nur wenigen Untersuchern zur Verfügung.
Als internationaler Standard wurde in der Mehrzahl ein Schaf-Plasma-EPO-Standard (Step 3) oder ein dagegen geeichtes EPO-reiches Serum benutzt. Untersuchungen in zehn verschiedenen Laboratorien zeigten bei Eichung der benutzten EPO-Standards gegen die erste Referenzpräparation für 10 Einheiten EPO-Werte zwischen 5,4 und 19,1 Einheiten (!) (RADTKE et al., 1979).

Die eigenen Ergebnisse (s. Tabellen 7 und 10) liegen in der gleichen Größenordnung wie die von DUNN und GIPSON (1983).
Aus diesen Werten und den Befunden über die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse kann geschlußfolgert werden, daß die FMLZ-Kultur sich bei der Benutzung von ^{3}H-TdR als Indikatornuklid als empfindliche Methode zur quantitativen Bestimmung von EPO und ESA in Plasmen eignet. Das Testsystem wurde daher zur Überprüfung der klinischen Anwendbarkeit erprobt und zur Bestimmung der ESA-Titer in Plasmen von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, aplastischer Anämie und Polyzythämia vera genutzt.

Erwartungsgemäß wurden sehr hohe ESA-Titer im Plasma von Patienten mit aplastischer Anämie gefunden (die in dreifacher Höhe des Wertes für gepooltes Normalplasma lagen) und deutlich erniedrigte Spiegel im Plasma von Patienten mit Polyzythämia vera (s. Tabelle 7).

Die ESA-Spiegel in Plasmen von Kindern mit terminaler Niereninsuffizienz waren individuell verschieden (s. Tabelle 7).
Wie die Abb. 15 zeigt, bestand eine positive Korrelation zwischen dem ESA-Gehalt des urämischen Plasmas und dem Hämatokrit; d.h., die von nierengesunden anämischen Patienten (z.B. Patienten mit aplastischer Anämie) bekannte negative Korrelation zwischen EPO-Konzentration und Hämatokrit war umgekehrt (KOCH und RADTKE, 1979).
Da höheren Hämatokritwerten höhere ESA-Konzentrationen zugeordnet waren, kann geschlußfolgert werden, daß das Ausmaß der renalen Anämie nicht unwesentlich vom EPO bzw. ESA-Gehalt im Plasma bestimmt wird.

So läßt sich die schwere Anämie von drei binephrektomierten Hämodialysekindern (M.Z., K.G., D.K.) primär durch einen absoluten ESA-Mangel (deutlich erniedrigte ESA-Werte verglichen mit dem für Normalplasma bestimmten Wert 0,55 E/ml) erklären.
Die anderen untersuchten, ebenfalls terminal niereninsuffizienten Kinder hatten ESA-Spiegel, die mit denen der Normalplasmen vergleichbar waren (s. Tabelle 7).
Hier spielen Unterschiede in der Größe des noch funktionierenden Restparenchyms der Niere und die Fähigkeit extrarenaler EPO-Bildungsstätten der Hämodialysepatienten sicher eine Rolle.
Gleichzeitig ergibt sich aus den Befunden der Eindruck, daß ein EPO- oder ESA-Mangel nicht die alleinige Ursache der renalen Anämie sein kann, sondern zusätzliche Faktoren bei diesen Kindern die Anämie bestimmen (s. 1. und 2.3.2.).
Verglichen mit den hohen ESA-Werten von anämischen nierengesunden Patienten besteht auch bei den Hämodialysekindern mit EPO-Spiegeln im Normalbereich ein - wenn auch relativer - EPO-Mangel. Der nierengesunde Organismus reagiert auf eine Anämie mit erhöhter EPO-Bildung. Die hochgradig geschädigte Niere der Hämodialysepatienten ist jedoch nicht fähig, den erhöhten Anforderungen an die EPO-Bildung nachzukommen.
Die Entwicklung der Höhe der EPO-Konzentration erscheint als Resultat zweier sich überlagernder Einflüsse:
„Einerseits wächst der Stimulus zur vermehrten EPO-Produktion mit Zunahme der Urämie und Anämie bei fortschreitender Nierenschrumpfung, andererseits erschwert gerade eben dieser Parenchymschwund die vermehrte EPO-Bildung." (RADTKE, 1978 a)

Für die Entwicklung verschiedener Symptome bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz werden sogenannte „Urämietoxine" verantwortlich gemacht (s. 2.3.2.), z.B. für Wachstums- und Pubertätsstörungen (GILLI, 1975), eine Polyneuropathie (FUNCK-BRENTANO et al., 1975), eine Thrombozytenfunktionsstörung (RABINER et al., 1975), eine Enzephalopathie (RASKIN et al., 1976) und die urämische Osteopathie (RITZ et al., 1975).
Auch die Entstehung der renalen Anämie wird auf das Wirken dieser Substanzen zurückgeführt (s. 2.3.2.).
Studien zur Isolierung, biochemischen Identifizierung und Charakterisierung der biologischen Wirkung von Toxinen, welche in der Urämie eine Rolle spielen könnten, haben bisher „nur einige wirklich befriedigende Resultate" (CONTRERAS et al., 1982) gebracht.
Schwerpunkte der Forschungsarbeit auf diesem Gebiet liegen daher in der immer weiteren Auftrennung des urämischen Plasmas und Isolierung der „Toxine" und in der Suche nach geeigneten Testsystemen zur Kennzeichnung ihrer biologischen Wirkung.
In der Literatur finden sich die verschiedensten Testsysteme, die die biologische Aktivität des urämischen Plasmas bzw. der isolierten Fraktionen in vivo oder in vitro bestimmen (s. 2.3.2.).
Auch über eine Hemmwirkung von urämischem Plasma auf die Erythropoese berichtet eine Reihe von Autoren.
Als Testsysteme wurden sowohl der Polyzythämische Maus-Assay (MORIYAMA et al., 1970; SCIGALLA et al., 1981) als auch Knochenmarkkulturen (BRUNNER et al., 1974; HELLWEGE et al., 1978; OHNO et al., 1977; WALLNER et al., 1975, 1976) benutzt.
Die Effekte wurden an der Beeinflussung des ^{59}Fe-Einbaus in das Hämoglobin und der BFU-E bzw. CFU-E Koloniebildung bestimmt.

Über eine Anwendung der FMLZ-Kultur als Testsystem und Nutzung des ^{3}H-TdR-Einbaus als Indikator für den Nachweis von Hemmstoffen der Erythropoese ist bisher nichts bekannt. Effekte von Plasmen urämischer Kinder auf den ^{3}H-TdR-Einbau in FMLZ und somit auf die Proliferation erythroider Vorläuferzellen sind noch nicht untersucht worden. Unsere Absicht bestand gerade darin, anhand der Messung der DNS-Synthese eine andere und breitere Palette von Target-Zellen der „Urämie-Toxine" (s. 2.3.2.) erfassen zu können, als das mit dem ^{59}Fe-Einbau möglich gewesen wäre.
Zum Nachweis von Urämietoxinen in der FMLZ-Kultur wurde dieses Testsystem modifiziert. Als Kontrolle wurden EPO-**stimulierte** Kulturen verwendet, und der Effekt von Inhibitoren der Erythropoese wurde an der Reduktion des EPO-Effektes nachgewiesen.
Alle untersuchten urämischen Plasmen bewirkten einen signifikant niedrigeren ^{3}H-TdR-Einbau in die EPO-stimulierten FMLZ als Normalplasma (s. Abb. 16).
Im urämischen Plasma müssen daher entweder ein Mangel von stimulierenden Faktoren (EPO, BPA, EEF) und/oder Hemmstoffe der Erythropoese (Proliferationshemmstoffe) vorhanden sein. Da Gesamtplasmen untersucht wurden, sind die Ergebnisse stets Resultate der Wirkung von stimulierenden und hemmenden Faktoren.

Zur Differenzierung der antagonistischen Effekte wurden die höhermolekularen Bestandteile des Plasmas (einschließlich EPO) durch Ultrafiltration von nieder- und mittelmolekularen Komponenten getrennt. Die so erhaltenen Ultrafiltrate urämischer Plasmen zeigten eine deutliche Hemmwirkung auf die Proliferation der FMLZ (s. Abb. 17).
Damit wurde der Beweis erbracht, daß urämische Plasmen die Proliferation erythroider Zellen hemmen.

HELLWEGE et al. (1978) und OHNO et al. (1977), welche die Wirkung von Urämieplasmen auf erythroide Koloniebildung in vitro untersuchten, zeigten, daß auch die erythroiden Vorläuferzellen (CFU-E), in denen noch keine intensive Hämoglobinsynthese abläuft, in ihrer Proliferation beeinflußt sind.
Aus der Hemmung der Proliferation anderer Zellarten in anderen Testsystemen (s. 2.3.2.) folgt jedoch, daß es sich bei der Wirkung der urämischen Plasmen um keine spezifische Beeinflussung der erythroiden Zellen, sondern um unspezifisch wirkende Proliferationsinhibitoren handelt, die den sogenannten „Mittelmolekülen" zuzuordnen sind und als „Urämietoxine" diskutiert werden (s. 2.3.2.). Dies folgt auch daraus, daß sie zwar in den getesteten Ultrafiltraten (Molekulargewicht < 20 000 Dalton) enthalten sind, nach Hämodialyse der Patienten aber nur ein geringfügiger Abfall ihrer Aktivität im Plasma eintritt (s. Tabelle 9).

Ziel der weiteren wissenschaftlichen Arbeit muß es sein, Art und Wirkungsweise der hemmenden Substanzen weiter zu charakterisieren, um sie durch ein entsprechendes Dialyseregime aus dem Blut der chronisch nierenkranken Kinder entfernen zu können.
Im Sinne dieser Zielstellung ist die FMLZ-Kultur in der beschriebenen Variante als hochempfindliche, gut reproduzierbare und leicht handhabbare Methode für die Testung kleinster Materialmengen (Plasmen, Sera, Subfraktionen) geeignet.

6. Zusammenfassung

Die renale Anämie ist eines der Hauptsymptome bei chronischer Niereninsuffizienz. Besonders betroffen sind Hämodialysekinder, deren Lebensqualität und Transplantationsbereitschaft in starkem Maße von der Anämie und ihren Komplikationen abhängen.
In der Pathogenese der renalen Anämie spielen neben ständigen kleineren Blutverlusten der urämischen Patienten, verstärkter Hämolyse im urämischen Milieu und Erythropoietinmangel der hemmende Einfluß sogenannter „Urämietoxine" auf die Erythropoese eine Rolle.
Zur Einschätzung der Erythropoese-stimulierenden Aktivität (Erythropoietin) im Plasma von Hämodialysekindern und zum Nachweis des Hemmeffektes von „Urämietoxinen" auf die Erythropoese wurde die Wirkung normaler und urämischer Plasmen auf die DNS-Synthese fötaler Mäuseleberzellen (> 90 % erythroide Zellen) in vitro untersucht.
Im Gegensatz zu vergleichbaren Untersuchungen, die Erythropoese beeinflussende Wirkungen zumeist anhand des Einbaus von ^{59}Fe als Maß für erythroide Differenzierung charakterisieren, wurde mit der Beeinflussung des ^{3}H-Thymidin-Einbaus die Wirkung der Testmaterialien auf die Proliferation erythroider Zellen bestimmt.

Nach Stimulierung der Kulturen mit steigenden Konzentrationen von Erythropoietin wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erhalten, die bei logarithmischer Transformation einen linearen Bereich zwischen 0,006 und 0,1 Einheiten Erythropoietin pro Kultur hatten.
Die kleinste Konzentration, die noch einen signifikant erhöhten ^{3}H-Thymidin-Einbau stimulierte, betrug 0,005 Einheiten.

Damit erweist sich die Empfindlichkeit der fötalen Mäuseleberkultur um ein Vielfaches höher als die anderer Tests (polyzythämischer Mäuse-Assay, Knochenmarkkultur).

Die Verwendung von ^{3}H-Thymidin umgeht einen wesentlichen Mangel der Tests, die ^{59}Fe als Indikator für die Wirkung der Testmaterialien benutzen. Das unkontrollierte Einschleppen von Eisen in die Kultur mit den Testmaterialien (Plasma) und die dadurch bedingte „Verdünnung" des ^{59}Fe und falsch-negative Werte (scheinbare Hemmung des ^{59}Fe-Einbaus) werden verhindert.

In Analogie zum Erythropoietin ergaben sich bei Testung von normalen und urämischen Plasmen ebenfalls in bestimmten Dosisbereichen lineare, zu den Kurven der Erythropoietin-Standards parallele Kurven, aus deren Lage die Erythropoese-stimulierende Aktivität (ESA) des Plasmas bestimmt werden konnte.
Diese Werte (0,43 - 0,75 ESA-Einheiten/ml für Normalplasma, 0,24 - 0,72 ESA-Einheiten/ml für urämisches Plasma) liegen im Bereich der „EPO"-Werte, die auch mit anderen biologischen Methoden gefunden wurden.
Die erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven lassen sich durch line_are Gleichungen beschreiben, die durch hohe Korrelationskoeffizienten (r) charakterisiert sind. Dies und der mit < 10 % relativ kleine Variabilitätskoeffizient der experimentellen Meßwerte (^{3}H-Thymidin-Einbauraten) belegt die gute Reproduzierbarkeit und sichere Auswertbarkeit der Methode.

Die mit urämischen Plasmen bestimmten Werte lassen auf einen für den hohen Anämiegrad deutlichen, aber individuell unterschiedlichen Mangel an Erythropoietin bzw. ESA der Patienten schließen, der mit dem Ausmaß der bestehenden Anämie korrelierte.

Zum Nachweis von Inhibitoren der Erythropoese wurde die Wirkung normaler und urämischer Plasmen auf den ^{3}H-Thymidin-Einbau durch Erythropoietin-stimulierte Kulturen gemessen.
Während Normalplasmen und Erythropoietin synergistisch wirken und den ^{3}H-Thymidin-Einbau überadditiv steigern, reduzieren urämische Plasmen den Erythropoietineffekt. Nach Abtrennung des in den Plasmen enthaltenen Erythropoietins u.a. höhermolekularer Faktoren (ESA) durch Ultrafiltration (Ausschlußgrenze > 20 000 Dalton) war dieser Hemmeffekt des urämischen Plasmas noch deutlicher nachweisbar.
Dieser zur Erythropoietinwirkung antagonistische Effekt urämischer Plasmen ist auf die Wirkung von „Urämietoxinen", wahrscheinlich sogenannter „Mittelmoleküle" zurückzuführen, die mit der erprobten methodischen Variante quantitativ erfaßt werden können.

Durch Vergleich der Wirkung urämischer Plasmen von niereninsuffizienten Kindern unmittelbar vor und nach Hämodialyse ließ sich zeigen, daß diese Inhibitoren durch die Dialysebehandlung nicht wirksam entfernt werden.

Insgesamt kann eingeschätzt werden, daß fötale Mäuseleberzellkulturen in der erprobten Form sich als empfindliches, leicht handhabbares und gut reproduzierbares Testsystem für den Nachweis stimulierender und hemmender Effekte auf die Proliferation erythroider Zellen erwiesen haben und zur Anwendung für die weitere Forschungsarbeit wie die Charakterisierung von „Urämietoxinen" bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz geeignet sind.

7. Literaturverzeichnis

ABIKO, T.; KUMIKAWA, M.; HIGUCHI, H.; SEKINO, H.:
Identifikation and synthesis of a heptapeptide in uremic fluid.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 184 - 194 (1978)

ASABA, H.:
Accumulation and excretion of middle molecules.
Clin. Nephrol. 19, 116 - 123 (1983)

ASABA, H.; ALVESTRAND, A.; FÜRST, P.; BERGSTRÖM, J.:
Clinical implications of uremic middle molecules in regular hemodialysis patients.
Clin. Nephrol. 19, 179 - 187 (1983)

ASH, S.R.; BUNGU, Z.T.J.; REGNIER, F.E.:
Anion exchange chromatography and double-diffusion cells for the study of middle molecules.
Kidney Int. 24, 250 - 255 (1983)

BABB, A.L.; POPOVICH, R.P.; CHRISTOPHER, T.G.; SCRIBNER, B.H.:
The genesis of the sqare meter-hour hypothesis.
Trans. Am. Soc. artif. internal Organs 17, 81 - 91 (1971)

BATEMAN, A.E.:
Cell specificity of chalone-type inhibitors of DNA synthesis released by blood leucocytes and erythrocytes.
Cell Tissue Kinet. 7, 451 - 461 (1974)

BERGSTRÖM, J.; FÜRST, P.:
Uremic toxins.
Kidney Int. 13, 9 - 12 (1978)

BERGSTRÖM, J.; FÜRST, P.; ZIMMERMANN, L.:
Uremic middle molecules exist and are biological active.
Clin. Nephrol. 11, 229 - 328 (1979)

BESSLER, H.; NOTTI, I.; DJALDETTI, M.:
Quantitative determination of human plasma erythropoietin using embryonic mouse liver erythroblasts.
Acta Haematol. 63, 204 - 210 (1980)

BILLAT, C.L.; FELIX, J.M.; JACQUOT, R.L.:

In vitro and in vivo regulation of hepatic erythropoiesis by erythropoietin and glucocorticoids in the rat fetus.
Exp. Hematol. 10, 133 - 140 (1982)

BOVERMANN, G.; RAUTENSTRAUCH, H.; JUNG, G.:

Trennung von Mittelmolekülen aus Hämodialysaten und Toxizitätstests in biologischen Systemen.
Nieren- Hochdruckkrankh. 3, 125 - 132 (1980)

BRANDAN, N.C.; COTES, P.M.; ESPADA, J.:

In vitro assay of erythropoietin in fetal mouse liver cultures.
I. Comparision of radioactive tracers and evidence of assay specificity.
Br. J. Haematol. 47, 461 - 468 (1981 a)

BRANDAN, N.C.; COTES, P.M.; ESPADA, J.:

In vitro assay of erythropoietin in fetal mouse liver cultures.
II. Effects of human transferrin bound iron and of serum on the stimulation of incorporation of ^{3}H-thymidine into DNA.
Br. J. Haematol. 47, 469 - 478 (1981 b)

BRAUN, J.L.; GREENBERG, H.M.; ROBINSON, S.H.:

Hemopoietic progenitor cells in short-term culture: effects of erythropoietin and endotoxin contamination of erythropoietin preparations.
Exp. Hematol. 7, 189 - 196 (1979)

BRUNNER, H.; BRUNNER, A.; ESSERS, U.; HUNTZ, R.:

Inhibition of bone marrow cell proliferation by undialyzable fractions from human urine.
In: Renal insufficiency. Ed.: HEIDLAND, A.; HENNEMANN, H.; KULT, J.
Thieme-Verlag, Stuttgart, 90 - 97 (1976)

BRUNNER, H.; MANN, H.; ESSERS, U.; SCHULTHEISS, R.; BYRNE, T.; HEINTZ, R.:

Preparative isolation of middle molecular weight fractions from the hemofiltrate of patients with chronic uremia.
Artif. Organs 2, 375 - 377 (1978)

BRUNNER, H.; ESSERS, U.; MANN, H.:

Zur Isolierung von sog. „Urämietoxinen" aus dem Hämofiltrat von Patienten mit chronischer Urämie.
Nieren- Hochdruckkrankh. 1, 26 - 30 (1979)

CHANDRA, M.; GARCIA, J.F.; MILLER, M.E.; WALDBAUM, R.S.; BLUESTONE, P.A.; Mc VICAR, M.:

Normalization of hematocrit in a uremic patient receiving hemodialysis: Role of erythropoietin.
J. Pediatr. 103, 80 - 83 (1983)

CHUI, D.H.K.; DJALDETTI, M.; MARKS, P.A.; RIFKIND, R.A.:

Erythropoietin effects on fetal mouse erythroid cells. I. Cell population and hemoglobin synthesis.
J. Cell. Biol. 51, 585 - 593 (1971)

CICHOCKI, T.; HANICKI, Z.; KLEIN, A.; KOMOROWSKA, Z.; SARNECKA-KELLER, M.; SULOWICZ, W.:

Influence of middle-moleculare weight solutes from dialysate on the migration rate of leukozytes.
Kidney Int. 17, 231 - 236 (1980)

CLINE, M.J.; GOLDE, D.W.:

Cellular interactions in haematopoiesis.
Nature 277, 177 - 181 (1979)

COHEN, R.A.; MILLER, M.E.; GARCIA, J.F.; MOCCIA, G.; CRONKITE, E.P.:

Regulatory mechanism of erythropoietin production: effects of hypoxemia and hypercarbia.
Exp. Hematol. 9, 513 - 521 (1981)

CONTRERAS, P.; LATER, R.; NAVARRO, J.; TOURAINE, J.L.; FREYRIA A.M.; TRAEGER, J.:

Molecules in the middle molecular weight range.
Nephron 32, 193 - 201 (1982)

CUEILLE, G.; MAN, N.K.; SAUSSE, A.; FARGES, J.P.; FUNCK-BRENTANO, J.L.:

Further characterisation of a neurotoxic uremic molecules.
Proc. 8th Int. Congr. Nephrol., Athens 606 - 617 (1981)

DATTA, M.C.; DUKES, P.P.:

Comparision of the effects of crude and purified erythropoietin on the synthesis of hemoglobon in rat bone marrow cell cultures.
Exp. Hematol. 10, 689 - 697 (1982)

DAVIES, S.; GLYNNE-JONES, E.; BISSON, M.; BISSON, P.:

Plasma erythropoietin assay in patients with chronic renal failure.
J. Clin. Path. 28, 875 - 878 (1975)

DE GOWIN, R.L.; HOFSTRA, D.; GURNEY, C.W.:

The mouse with hypoxia induced erythremia, an erythropoietin bioassay animal.
J. Lab. Clin. Med. 60, 846 - 852 (1962)

DE KLERK, G.; KRUISWIJK, C.; HART, A.A.M.; GOUDSMIT, R.:

Modified method of erythropoietin (ESF) bioassay in vitro using mouse fetal liver cells.
I. Effect of serum iron on ^{59}Fe incorporation into heme.
II. Measurement of ESF in human serum.
Blood 52, 560 - 577 (1978 a)

DE KLERK, G.; VON DEM BORNE, A.E.G.KR.; GOUDSMIT, R.:

The nature of toxicity of human serum in the bioassay for erythropoietin using mouse fetal liver cells.
Exp. Hematol. 6, 193 - 200 (1978 b)

DE KLERK, G.; OTTEN-KRUISWIJK, C.; GOUDSMIT, R.:

Factors in human serum influencing its dose-response curve in the bioassay for erythropoietin using mouse fetal liver cells.
Br. J. Haematol. 35, 672 (1977)

DINKELAAR, R.B.; HART, A.A.M.; ENGELS, E.Y.; SCHOEMAKER, L.P.; CHAMULEAU, R.A.F.M.; BOSCH, E.:

Metabolic studies on erythropoietin (Ep):
I. A reliable micro assay method for Ep in rat plasma using fetal mouse liver cells (FMLC).
II. The role of liver and kidney in the metabolism of Ep.
Exp. Hematol. 9, 788 - 803 (1981)

DUNN, C.D.R.; LANGE, R.D.;

Erythroid regulatory factors: correlation of detectable titers in vivo and in vitro.
Blood 52, 1238 - 1242 (1978 a)

DUNN, C.D.R.; NAPIER, J.A.F.:

Technical comments on the bioassay of erythropoietin.
Exp. Hematol. 6, 577 - 584 (1978)

DUNN, C.D.R.; LANGE, R.D.; JONES, J.B.:

Evidence that the fetal mouse liver cell assay detects erythroid regulatory factors (ERF) not measured with a standard in vivo assay.
Exp. Hematol. 7, 519 - 523 (1979)

DUNN, C.D.R.; DAVIDSON, J.W.:

Technological modifications of the in vitro fetal mouse liver cell (FMLZ) assay for erythropoietin (Ep).
Exp. Hematol. 9, 194 (1981 b)

DUNN, C.D.R.; GIBSON, L.:

Erythropoietin bioassays using fetal mouse liver cells: validations and technical improvements.
Exp. Hematol. 11, 590 - 600 (1983)

DUNN, C.D.R.:

Cyclic hematopoiesis: The biomathematics.
Exp. Hematol. 11, 779 - 791 (1983)

DZURIK, R.; HUPKOVA, V.; CERNACEK, P.; VALOVICOVA. E.; NIEDERLAND, T.R.:

The isolation of an inhibitor of glucose utilization from the serum of uraemic subjects.
Clinica Chim. Acta 46, 77 - 83 (1973)

EAVES, C.J.; HUMPHRIES, R.K.; KRYSTAL, G.; EAVES, A.C.:

Erythropoietin action: models, data, and speculation.
In: Hemoglobins in development and differentiation, 63 - 72 (1981)

EGGERT, W.:

Veränderungen roter Blutzellen von Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz.
Dissertationsschrift (B), Berlin (1982)

ELIASON, J.F.; DEXTER, T.M.; TESTA, N.G.:

The regulation of hemopoiesis in long-term bone marrow cultures.
III. The role of burst forming activity.
Exp. Hematol. 10, 444 - 450 (1982)

ERSLEV, A.J.:

In vitro production of erythropoietin by kidneys perfused with a serum-free solution.
Blood 44, 77 - 85 (1974)

ESSERS, U.; BRASS, H.; SPICHER, K.:

Die aplastische Anämie bei Niereninsuffizienz - eine inhibitorische Wirkung des Urämieserums auf Erythropoietin.
Klin. Wochenschr. 48, 92 - 95 (1970)

FINNEY, D.J.:

A computer program for parallel line bioassays.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 198, 497 - 506 (1976)

FISHER, J.W.; HATCH, F.E.; ROH, B.L.; ALLEN, R.C.; KELLEY, B.J.:

Erythropoietin inhibitor in kidney extracts and plasma from anemic uremic human subjects.
Blood 31, 440 - 452 (1968)

FREDRICKSON, T.N.; SMITH, K.A.; CORNELL, C.J.; JASMIN, C.; MC INTYRE, O.R.:

The interaction of erythropoietin with fetal liver cells. I. Measurement of proliferation by tritiated thymidine incorporation.
Exp. Hematol. 5, 254 - 265 (1977)

FRIED, W.:

The liver as a source of extrarenal erythropoietin.
Blood 40, 671 - 677 (1972)

FRIED, W.; BARONE-VARELAS, J.; BARONE, T.:

The influence of age and sex on erythropoietin titers in the plasma and tissue homogenates of hypoxic rats.
Exp. Hematol. 10, 472 - 477 (1982)

FÜRST, P.; BERGSTRÖM, J.; GORDON, A.; JOHNSSON, E.; ZIMMERMANN, L.:

Separation of peptides of „middle" molecular weight from biological fluids of patients with uremia.
Kidney Int. 7, 272 - 275 (1975)

FUHR, J.E.; DUNN, C.D.R.:

Thyroid hormones and protein synthesis in fetal mouse liver erythroid cells.
Exp. Hematol. 7, 490 - 494 (1979)

FUNCK-BRENTANO, J.L.; MAN, N.K.; SAUSSE, A.; CUEILLE, G.; ZINGRAFF, J.; DRUEKE, T.; JUNGERS, P.; BILLON, J.P.:

Neuropathy and „middle" molecule toxins.
Kidney Int. 7, 352 - 356 (1975)

GARCIA, J.F.; SHERWOOD, J.; GOLDWASSER, E.:

Radioimmunoassay of erythropoietin.
Blood Cells 5, 405 - 419 (1979)

GELLER, G.; KRIVIT, W.; ZALUSKY, R.; ZANJANI, E.D.:

Lack of erythropoietic inhibitory effect of serum from patients with congenital pure red cell aplasia.
J. Pediatr. 86, 198 - 201 (1975)

GEARY, D.F.; FENNELL, R.S.; BRAYLAN, R.C.; IRAVANI, A.; GARIN, E.H.; RICHARD, R.C.:

Hyperparathyroidism and anemia in chronic renal failure.
Eur. J. Pediatr. 139, 296 - 298 (1982)

GIGLIO, M.J.; ALIPPI, R.M.; BOZZINI, C.E.:

Inhibition by dexamethasone of erythropoietin-induced amplification of the erythropoietin-responsive cell compartment.
Exp. Hematol. 9, 444 - 448 (1981)

GILLI, G.:

Therapie der Wachstumsstörung bei chronischer Niereninsuffizienz.
Monatsschr. Kinderheilkd. 123, 772 - 773 (1975)

GOLDWASSER, E.; ELIASON, J.F.; SIKKEMA, D.:

An assay for erythropoietin in vitro at the milliunit level.
Endocrinology 97, 315 - 323 (1975 a)

GOLDWASSER, E.:

Erythropoietin and the differentiation of red blood cells.
Fed. Proc. 34, 2285 - 2293 (1975 b)

GOLDWASSER, E.:

Erythropoietin.
Blut 33, 135 - 140 (1976)

GOLDWASSER, E.; SHERWOOD, J.B.:

Annotation
Radioimmunoassay of erythropoietin.
Br. J. Haematol. 48, 359 - 363 (1981 a)

GOLDWASSER, E.:

Erythropoietin and red cell differentiation.
Control of cellular division and development: Part A:
487 - 494 (1981 b)

GRABER, S.E.; KRANTZ, S.B.:

Erythropoietin and the control of red cell production.
Ann. Rev. Med. 29, 51 - 66 (1978)

GROSSMANN, P.:

Pädiatrische Nephrologie.
VEB Thieme-Verlag, Leipzig (1970)

GRUBER, D.F.; ZUCALI, J.R.; MIRAND, E.A.:

Identification of erythropoietin producing cells in
fetal mouse liver cultures.
Exp. Hematol. 5, 392 - 398 (1977)

GUDIM, V.I.; SCIGALLA, P.; IVANOVA, V.S.; MOSKALEVA,
G.P.; OLBACH, K.:

Izučenie ėfekta ureličeskoj syvorotki i ee frakcij po
stolovuju kletku „in vivo".
Bjull. Eksp. Biol. Med. 5, 592 - 594 (1980)

GUDIM, V.I.; SCIGALLA, P.; DEVAUX, S.; IVANOVA, V.S.;
GORBUNOVA, N.A.; FEDOROW, N.A.; GROSSMANN, P.:

Kliničeskoe značenie srednich molekul v patogeneze
nefrogennoj anemii.
Ter. Archiv 6, 78 - 82 (1983)

HAGA, P.; FALKANGER, B.:

In vitro assay for erythropoietin: erythropoid colony
formation in methyl cellulose used for the measurement
of erythropoietin in plasma.
Blood 53, 1172 - 1181 (1979)

HALVORSEN, S.:

Inhibitors of erythropoiesis.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 34, 193 - 198 (1974)

HANICKI, Z.; CICHOCKI, T.; SARNECKA-KELLER, M.;
KLEIN, A.; KOMOROWSKA, Z.:

Influence of middle-sized molecule aggregates from
dialysate of uremic patients on lymphocyte transformation
in vitro.
Nephron 17, 73 - 80 (1976)

HEIDEMANN, E.:

Humorale Regulatoren der Zellproliferation in der Hämatopoese.
II. Erythropoese, Megakaryopoese, pluripotente Stammzelle.
Klin. Wochenschr. 58, 1167 - 1174 (1980)

HEILMANN, E.:

Erythropoietin in Klinik und Forschung.
Folia Haematol. 107, 817 - 823 (1980)

HEILMANN, E.; GRAEFE, U.; HOLZKNECHT, A.; FAHRENKRUG, H.:

Stimulation hämatopoietischer Vorläuferzellen durch Serumproben von Patienten mit Polycythaemia vera.
Schweiz. med. Wochenschr. 111, 1536 - 1538 (1981)

HEILMANN, E.; GRAEFE, U.; STEINHAUSEN, R.:

Effekt der Hämodialyse auf das Wachstumsverhalten hämatopoetischer Stammzellen in Methylzellulose-Kulturen bei terminaler Niereninsuffizienz.
Nieren- Hochdruckkrankh. 12, 72 - 75 (1983)

HEIM, L.R.:

Erythropoietin: What's in a name.
Exp. Hematol. 8, 229 - 230 (1980)

HELLWEGE, H.H.; BLÄKER, F.; NETH, R.:

In vitro studies of bone marrow stem-cell function in uraemic children.
Eur. J. Pediatr. 129, 279 - 284 (1978)

IVERSEN, O.H.:

The chalones.
In: Tissue growth factors, Handbook of experimental pharmacology.
Ed.: BASERGA, R.; Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 491 - 532 (1981)

JEFFREY, M.L.; KUDISCH, M.; NATHAN, D.G.:

Response of three classes of human erythroid progenitors to the absence of erythropoietin in vitro as a measure of progenitor maturity.
Exp. Hematol. 9, 1035 - 1041 (1981)

JELKMANN, W.; KURTZ, A.; BAUER, C.:

Extraction of erythropoietin from isolated renal glomeruli of hypoxic rats.
Exp. Hematol. 11, 581 - 588 (1983)

KIGASAWA, H.; NISHIHIRA, H.:

Short communication. High human erythroid burst-forming activity in sera from childhood aplastic in anaemia in semi-solid agar.
Br. J. Haematol. 46, 303 - 305 (1980)

KIVILAAKSO, E.; RYTÖMAA, T.:

The effect on polycythaemic serum on the proliferation of rat bone marrow cells in vitro.
Cell Tissue Kinet. 3, 385 - 392 (1970)

KIVILAAKSO, E.:

In vitro assay of the stimulatory effect of hypoxic serum on cellular proliferation in the erythron.
Acta Physiol. Scand. 80, 412 - 419 (1970)

KIVILAAKSO, E.; RYTÖMAA, T.:

Erythrocytic chalone, a tissue-specific inhibitor of cell proliferation in the erythron.
Cell Tissue Kinet. 4, 1 - 9 (1971)

KOCH, K.M.; RADTKE, H.W.:

Die Rolle des Erythropoietinmangels in der Pathogenese der renalen Anämie.
Klin. Wochenschr. 57, 1031 - 1036 (1979)

KRANTZ, S.B.; GALLIEN-LARTIGUE, O.; GOLDWASSER, E.:

The effect of erythropoietin upon heme synthesis by marrow cells in vitro.
J. Biol. Chem. 238, 4085 - 4090 (1963)

KRYSTAL, G.:

Physical and biological characterisation of erythroblast enhancing factor (EEF), a late acting erythropoietic stimulator in serum distinct from erythropoietin.
Exp. Hematol. 11, 18 - 31 (1983)

KRZYMOWSKI, T.; KRZYMOWSKA, H.:

Studies on the erythropoiesis inhibiting factor in the plasma of animals with transfusion polycythemia.
Blood 19, 38 - 44 (1962)

KURATOWSKA, Z.; LEWARTOWSKI, B.; MICHULAK, E.:

Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organs.
Blood 18, 527 - 534 (1961)

LAFFERTY, M.D.; ACKERMANN, G.A.; DUNN, C.D.R.; LANGE, R.D.:

The ultrastructural, immunocytochemical demonstration of erythropoietin receptors on developing erythrocytic cells of fetal mouse liver.
Exp. Hematol. 8, 1063 - 1074 (1980)

LAPPIN, T.R.J.; RICH, I.; GOLDWASSER, E.:

The effect of erythropoietin and other factors on DNA synthesis by mouse spleen cells.
Exp. Hematol. 11, 661 - 666 (1983)

LEBER, H.W.; SPIEGELHALTER, R.; ULM, A.; GOUBEAUD, G.; RAWER, P.:

Influence of middle molecules on the anemia of uremic patients.
Artif. Organs 2, 378 - 381 (1978)

LEE-HUANG, S.:

Cloning and expression of human erythropoietin cDNA in Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2708 - 2712 (1984)

LINDEMANN, R.:

Erythropoiesis inhibiting factor (EIF).
I. Fractionation and demonstration of urinary EIF.
Br. J. Haematol. 21, 623 - 631 (1971)

LINDEMANN, R.:

Erythropoiesis inhibiting factor (EIF).
The inhibitory effect of oestrogens on erythropoiesis and the content of oestrogens in the urinary EIF.
Scand. J. Haematol. 11, 319 - 324 (1973)

LINDEMANN, R.:

Erythropoiesis inhibiting factor(s) in intact and haemolyzed red blood cells.
Scand. J. Haematol. 14, 216 - 225 (1975)

LINDEMANN, R.:

Erythropoiesis inhibiting factor(s) (EIF): Methodologic studies.
Blood 47, 155 - 163 (1976 a)

LINDEMANN, R.; LAERUM, O.D.:

Erythropoiesis inhibiting factor(s) (EIF): The specificity and toxicity of urinary EIF studied in vivo and in vitro.
Scand. J. Haematol. 17, 293 - 299 (1976 b)

LORD, B.I.; CERCEK, L.; CERCEK, B.; SHAH, G.P.; DEXTER, T.M.; LAITHA, L.G.:

Inhibitors of haemopoietic cell proliferation?: Specificity of action within the haemopoietic system.
Br. J. Cancer 29, 168 - 175 (1974)

MANOR, D.; NAPARSTEK, E.; HERSKO, C.:

In vitro bioassay of erythropoietin using synchronized rabbit erythroid precursors.
Exp. Hematol. 10, 241 - 246 (1982)

MARCHAL, G.; MILON, G.:

T cells as regulators of haematopoiesis.
Ann. Immunol. 135 C, 261 - 302 (1984)

MARKS, P.A.:

Differentiation of erythroid cells.
In: COURNS, J.; KAPLAN, N.O.; MARGOLIASH, E.; MARKS, P.A.; MÜLLER-EBERHARD, H.J.; PHILLIPS, D.C.; SLATER, E.C.; WOODRUFF, M.: The HARVEY Lectures, Academic Press, New York and London, 43 - 73 (1972)

MASSRY, S.G.:

Pathogenesis of the anemia of uremia: Role of secondary hyperparathyroidism.
Kidney Int. 24, 204 - 207 (1983)

MAURER, H.R.:

Potential pitfalls of ^{3}H-thymidin techniques to measure cell proliferation.
Cell Tissue Kinet. 14, 111 - 120 (1981)

MC GONIGLE, R.J.S.; HUSSERL, F.; WALLIN, J.D.; FISHER, J.W.:

Hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis effects on erythropoiesis in renal failure.
Kidney Int. 25, 430 - 436 (1984 a)

MC GONIGLE, R.J.S.; WALLIN, J.D.; SHADDUCK, R.K.; FISHER, J.W.:

Erythropoietin deficiency and inhibition of erythropoiesis in renal insufficiency.
Kidney Int. 25, 437 - 444 (1984 b)

MENYHART, J.; GRAF, J.:

Many hitherto unknown peptides are principal constituante of uremic „middle molecules".
Clin. Chem. 27, 1712 - 1716 (1981)

METCALF, D.:

Hemopoietic colony stimulating factors.
In: Handbook of experimental pharmacology. Tissue growth factors.
Ed.: BASERGA, R.; Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 343 - 374 (1981)

MEYRIER, A.; SIMON, P.; BOFFA, G.; BRISSOT, P.:

Uremia and the liver. I. The liver and erythropoiesis in chronic renal failure.
Nephron 29, 3 - 6 (1981)

MICHEL, A.:

Untersuchungen von erythrozytären Kriterien in der Perinatal- und Säuglingsperiode unter den Bedingungen der Hypoxie.
Dissertationsschrift (B), Berlin (1981)

MILLER, M.E.; GARCIA, J.F.; SHIUE, G.G.; OKULA, R.M.; CLEMONS, G.K.:

Humoral regulation of erythropoiesis.
Haemopoietic Stem Cells, Alfred Benzon Symposium 18.
Ed.: KILLMANN, Sv.-AA.; CRONKITE, E.P.; MÜLLER-BERAT, C.N.; MUNKSGAARD, Copenhagen, 217 - 233 (1983)

MONETTE, F.C.; QUELLETTE, P.L.; FALETRA, P.P.:

Characterization of murine erythroid progenitors with high erythropoietin sensitivity in vitro.
Exp. Hematol. 9, 249 - 256 (1981)

MORIYAMA, Y.; SAITO, H.; KINOSHITA, Y.:

Erythropoietin inhibitor in plasma from patiens with chronic renal failure.
Haematologia 4, 15 - 20 (1970 a)

MORIYAMA, Y.; SHIMOTORI, T.:

Studies on erythropoiesis inhibiting factor (EIF).
II. The site of formation of EIF.
Acta Haematol. 44, 321 - 326 (1970 b)

MORIYAMA, Y.; LERTORA, J.J.L.; FISHER, J.W.:

Studies on an inhibitor of erythropoiesis.
I. Effects of sera from normal and polycythemic rabbits on heme synthesis in rabbit bone marrow cultures.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 147, 740 - 743 (1974)

MORIYAMA, Y.; REGE, A.; FISHER, J.W.:

Studies on an inhibitor of erythropoiesis.
II. Inhibitory effects of serum from uremic rabbits on heme synthesis in rabbit bone marrow cultures.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148, 94 - 97 (1975)

MÜLLER-WIEFEL, D.E.:

Untersuchungen zur Pathogenese und Kompensation der renalen Anämie im Kindesalter.
Habilitationsschrift, Heidelberg (1981 a)

MÜLLER-WIEFEL, D.E.; SCHÄRER, K.:

Serum erythropoietin (EPO) in children with chronic renal failure (CRF).
Eur. J. Pediatr. 135, 338 (1981 b)

MÜLLER-WIEFEL, D.E.:

Pathogenese und Kompensation der renalen Anämie im Kindesalter.
Fortschr. Med. 100, 1765 - 1768 (1982)

NAPIER, J.A.F.; DUNN, C.D.R.; FORD, T.W.; PRICE, W.:

Pathophysiological changes in serum erythropoiesis stimulating activity.
Br. J. Haematol. 35, 403 - 409 (1977)

NAPIER, J.A.F.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.:

Erythropoietin measurements in the differential diagnosis of polycythaemia.
Br. J. Haematol. 48, 393 - 401 (1981)

NATHAN, D.G.; SYTKOWSKI, A.:

Editorial retrospective
Erythropoietin and the regulation of erythropoiesis.
N. Engl. J. Med. 308, 520 - 522 (1983)

NAVARRO, J.; GERLIER, D.; TOURAINE, J.L.; LABER, R.;
CONTRERAS, P.; DORE, J.F.; TRAEGER, J.:

A potent inhibitor of cell proliferation in middle molecules isolated from urine of uremic patients.
Biomedicine 31, 261 - 264 (1979)

NAVARRO, J.; CONTRERAS, P.; TOURAINE, J.L.; FREYRIA,
A.M.; LATER, R.; TRAEGER, J.:

Are „middle molecules" responsible for toxic phenomena in chronic renal failure?
Nephron 32, 301 - 307 (1982)

NEUMANN, E.:

Nachweis eines niedermolekularen Hemmfaktors der Erythropoese.
Wiener Klin. Wochenschr. 92, 71 - 80 (1980)

NEUWIRT, J.:

Erythropoietic precursor cells in cultures.
Blut 43, 65 - 69 (1981)

OHNO, Y.; FISHER, J.W.:

Inhibition of bone marrow erythroid colony-forming cells (CFU-E) by serum from chronic anemic uremic rabbits.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 156, 56 - 59 (1977)

OHNO, Y.; REGE, A.B.; FISHER, J.W.; BARONA, J.:

Inhibitors of erythroid colony-forming cells (CFU-E and BFU-E) in sera of azotemic patients with anemia of renal disease.
J. Lab. Clin. Med. 92, 916 - 923 (1978)

PAVLOVIC-KENTERA, V.; MILENKOVIC, P.; RUVIDIC, R.:
JOVANOVIC, V.; BILJANOVIC-PAUNOVIC, L.:

Erythropoietin in aplastic anemia.
Blut 39, 345 - 350 (1979)

PAUL, J.; HUNTER, J.A.:

Synthesis of macromolecules during induction of haemoglobin synthesis by erythropoietin.
J. Mol. Biol. 42, 31 - 41 (1969)

PESCHLE, C.:

Erythropoiesis.
Ann. Rev. Med. 31, 303 - 314 (1980)

PORTER, P.N.; OGAWA, M.; LEARY, A.G.:

Enhancement of the growth of human early erythroid progenitors by bone marrow conditioned media.
Exp. Hematol. 8, 83 - 88 (1980)

POTASMAN, I.; BETTER, O.S.:

The role of secondary hyperparathyroidism in the anemia of chronic renal failure.
Nephron 33, 229 - 231 (1983)

VON PREYSS, B.; GOUDSMIT, R.:

The problem of toxicity in the bioassay for erythropoietin using mouse fetal liver cells.
Exp. Hematol. 4, 138 - 142 (1976)

RABINER, S.F.:

Platelet function as an indikator of adequate dialysis.
Kidney Int. 7, 144 - 146 (1975)

RADTKE, H.W.; ERBES, P.M.; FASSBINDER, W.; KOCH, K.M.;

The variable role of erythropoietin deficiency in the pathogenesis of dialysis anaemia.
Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc. 14, 177 - 183 (1977)

RADTKE, H.W.:

Untersuchungen zur Bedeutung des Erythropoietinmangels in der Pathogenese der renalen Anämie.
Habilitationsschrift, Frankfurt am Main (1978 a)

RADTKE, H.W.; ERBES, P.M.; FASSBINDER, W.; KOCH, K.M.:

Serum erythropoietin measurement using fetal mouse liver cell culture: The importance of reduction of variation in the specific activity of radioiron-transferrin.
Exp. Hematol. 6, 468 - 472 (1978 b)

RADTKE, H.W.; CLAUSSNER, A.; ERBES, P.M.; SCHEUERMANN, E.H.; SCHOEPPE, W.; KOCH, K.M.:

Serum erythropoietin concentration in chronic renal failure: relationship to degree of anemia and excretory renal function.
Blood 54, 877 - 884 (1979)

RASCH, D.; ENDERLEIN, G.; HERRENDÖRFER, G.:

Biometrie, Verfahren, Tabellen, angewandte Statistik.
VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin (1973)

RASKIN, N.H.; FISHMAN, R.A.:

Neurologic disorders in renal failure.
N. Engl. J. Med. 294, 143 - 148 (1976)

REISSMANN, K.R.:

Studies on the mechanism of erythrocyte stimulation in parabiotic rats during hypoxia.
Blood 5, 372 - 380 (1950)

REISSMANN, K.R.; UDUPTA, K.B.:

Effect of erythropoietin on proliferation of erythropoietin-responsive cells.
Cell Tissue Kinet. 5, 481 - 486 (1972)

RINGOIR, S.M.G.; VAN LANDSCHOOT, N.; DE SMET, R.:

Inhibition of phagocytosis by a middle molecular fraction from ultrafiltrate.
Clin. Nephrol. 13, 109 - 112 (1980)

RITZ, E.:

Effect of a high molecular weight fraction of normal urine on bone cell metabolism.
Kidney Int. 7, 338 - 340 (1975)

ROSENGURT, E.:

Stimulation of DNA Synthesis in quiescent cultured cells: exogenous agents, internal signals, and early events. Current Topics in Cellular Regulation 17, 59 - 83 (1980)

RUGH, R.:

The mouse. Its reproduction and development.
Columbia University. Burgess Publishing Co., USA, 262 - 272 (1968)

SCARO, J.L.; MIRANDA, C.; MARTIN, B.M.; CARRERA, M.:

Erythropoietic changes effected by foreign serum in the mouse.
Acta Haematol. 63, 257 - 261 (1980)

SCHÄRER, K.; PARSONS, F.M.; BRUNNER, F.P.; BURCK, H.C.; GRÄSER, W.; GURLAND, H.J.; HÄRLEN, H.:

Combined report on regular dialysis and renal transplantation of children in Europe 1973. Report EDTA Registration Committee 1975.
Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc. 11, 3 - 14 (1974)

SCHOOTS, A.; MIKKERS, F.; CRAMERS, C.; DE SMET, R.; RINGOIR, S.:

Uremic toxins and the elusive middle molecules.
Nephron 38, 1 - 8 (1984)

SCIGALLA, P.; GUDIM, V.I.; IVANOVA, V.S.; FEDOROV, N.A.; GROSSMANN, P.:

On the inhibitory effect of the serum of uraemic children on erythropoiesis.
Acta Haematol. 64, 256 - 264 (1980 a)

SCIGALLA, P.; GUDIM, V.I.; IVANOVA, V.S.; MOSKALEVA, G.P.; NOACK, C.; DEVAUX, S.; GORBUNOVA, N.A.; GROSSMANN, P.:

Die Mittelmoleküle als Erythropoesehemmfaktoren im Blut terminal niereninsuffizienter Kinder
I. Mitteilung: Einfluß der urämischen Mittelmoleküle auf die ^{59}Fe-Einbaurate polyzythämischer Mäuse
Dtsch. Gesundh. wesen 35, 1331 - 1334 (1980 b)
II. Mitteilung: Über die Hemmwirkung von Mittelmolekülen aus dem Serum terminal niereninsuffizienter Kinder auf die Erythropoese intakter Mäuse.
Dtsch. Gesundh. wesen 35, 1366 - 1367 (1980 b)
III. Mitteilung: Wirkung der Mittelmoleküle aus urämischem Serum auf die pluripotenten Knochenmarkstammzellen in vivo.
Dtsch. Gesundh. wesen 35, 1422 - 1425 (1980 b)

SCIGALLA, P.:

Untersuchungen über Faktoren und Mechanismen der Regulation der Erythropoese in der terminalen Niereninsuffizienz.
Dissertationsschrift (B), Berlin (1981)

SHERWOOD, J.B.; GOLDWASSER, E.:

A radioimmunoassay for erythropoietin.
Blood 54, 885 - 893 (1979)

SJÖGREN, U.; THYSELL, H.:

Bone marrow morphology in patients on regular haemodialysis treatment.
Acta Haematol. 58, 332 - 338 (1977)

STOBBE, H.:

Untersuchungen von Blut und Knochenmark.
VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1977)

TENCKHOFF, H.; CURTIS, F.K.:

Experience with maintenance peritoneal dialysis in the home.
Trans. Am. Soc. artif. internal Organs 16, 90 - 95 (1970)

UDUPA, K.B.; REISSMANN, K.R.:

Stimulation of erythroblast formation in suspension cultures of murine marrow by a factor in normal mouse serum, and its relationship to erythropoietin.
Exp. Hematol. 8, 1106 - 1113 (1980)

URABE, A.; CHIBA, S.; KOSAKA, K.; TAKAKU, F.:

Response of uraemic bone marrow cells to erythropoietin in vitro.
Scand. J. Haematol. 17, 335 - 340 (1976)

WAHNER, E.:

Gewinnung von erythropoietinangereichertem Plasma von Mäusen und Ratten.
Dissertationsschrift (A), Berlin (1983)

WALLE, A.J.; WEILAND, E.; PROPPE, D.; NIEDERMAYER, W.:

Is the erythropoietin-hematocrit feedback control operative in chronic renal failure?
Nephron 31, 229 - 235 (1982)

WALLNER, S.F.; WARD, H.P.; VAUTRIN, R.; ALFREY, A.C.; MISHELL, J.:

The anemia of chronic renal failure: In vitro response of bone marrow to erythropoietin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149, 939 - 944 (1975)

WALLNER, S.F.; KURNICK, J.E.; WARD, H.P.; VAUTRIN, R.; ALFREY, A.C.:

The anemia of chronic renal failure and chronic diseases: In vitro studies of erythropoiesis.
Blood 47, 561 - 569 (1976)

WARD, H.P.:

An in vitro assay of erythropoietin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 17, 70 - 74 (1967)

WARDLE, D.F.H.; BAKER, I.; MALPAS, J.S.; WRIGLEY, P.F.M.:

Bioassay of erythropoietin using foetal mouse liver cells.
Br. J. Haematol. 24, 49 - 56 (1973)

WEINTRAUB, H.:

The organisation of red cell differentiation.
In: Cell cycle and cell differentiation.
Ed.: REINERT, J.; HOLTZER, H., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 27 - 40 (1975)

WHELDON, T.E.; KIRK, J.; ORR, J.S.; PAUL, J.; CONKIE, D.:

Kinetics of development of embryonic erythroid cells.
Cell Tissue Kinet. 7, 181 - 188 (1974)

WIDERÖE, T.-E.; SANENGEN, T.; HALVORSEN, S.:

Erythropoietin and uremic toxicity during continuous ambulatory peritoneal dialysis.
Kidney Int. 24, 208 - 217 (1983)

YANAGAWA, S.; HIRADE, K.; OHNOTA, H.; SASAKI, R.; CHIBA, H.; UEDASS, M.; GOTOSS, M.:

Isolation of human erythropoietin with monoclonal antibodies.
J. Biol. Chem. 259, 2707 - 2710 (1984)

ZAROULIS, C.G.; HOFFMAN, B.J.; KOURIDES, I.A.:

Serum concentrations of erythropoietin measured by radioimmunoassay in hematologic disorders and chronic renal failure.
Am. J. Hematol. 11, 85 - 92 (1981)

8. Anhang

Dosiswirkungsvergleich
Standard (EPO) Test (anämisches Mäuseplasma, I)

Ausgangswerte Testsubstanz

6.2500	189.0000	169.0000	143.0000	142.0000
12.5000	310.0000	393.0000	450.0000	
25.0000	599.0000	769.0000	597.0000	677.0000
50.0000	1139.0001	1602.0000	1183.9998	1448.0001

Ausgangswerte Standard

6.2500	174.0000	185.0000	198.0000	160.0000
12.5000	310.0000	289.0000	330.0000	316.0000
25.0000	701.0000	732.0000	704.0000	527.0000

Transformierte Werte Testsubstanz

0.7959	2.2765	2.2279	2.1553	2.1523
1.0969	2.4914	2.5944	2.6532	
1.3979	2.7774	2.8859	2.7760	2.8306
1.6990	3.0565	3.2047	3.0734	3.1608

Transformierte Werte Standard

0.7959	2.2405	2.2672	2.2967	2.2041
1.0969	2.4914	2.4609	2.5185	2.4997
1.3979	2.8457	2.8645	2.8476	2.7218

Titer 1.01926

	Test	Standard	Gesamt
A =	1.42891	1.48700	
B =	1.00109	0.94314	0.98438

Varianzanalyse

	SQ	FG	MQ
Gesamt	2.70424	26.	
Dosen	2.63748	6.	
Substanzen	0.18427	1.	
Regression	2.43524	1.	
Parallelität	0.00173	1.	0.00173
Linearität	0.01625	3.	0.00542
Rest(Fehler)	0.06676	20.	0.00334

F-Wert Parallelität (1., 20.) : 0.51886
F-Wert Lineraität (3., 20.) : 1.62238

Dosiswirkungsvergleich
Standard (EPO) Test (anämisches Mäuseplasma, II)

Ausgangswerte Testsubstanz

12.5000	285.0000	228.0000	173.0000	
25.0000	291.0000	322.0000	394.0000	432.0000
50.0000	747.0000	610.0000	472.0000	
100.0000	789.0000	1015.9999	941.0000	

Ausgangswerte Standard

12.5000	194.0000	197.0000	262.0000	
25.0000	377.0000	366.0000	341.0000	
50.0000	604.0000	643.0000	485.0000	
100.0000	929.0000	843.0000	1024.0000	997.0000

Transformierte Werte Testsubstanz

1.0969	2.4548	2.3579	2.2380	
1.3979	2.4639	2.5079	2.5955	2.6355
1.6990	2.8733	2.7853	2.6739	
2.0000	2.8971	3.0069	2.9736	

Transformierte Werte Standard

1.0969	2.2978	2.2945	2.4183	
1.3979	2.5763	2.5635	2.5328	
1.6990	2.7810	2.8082	2.6857	
2.0000	2.9680	2.9258	3.0103	2.9987

Titer 1.00804

	Test	Standard	Gesamt
A =	1.60158	1.56181	
B =	0.68286	0.70682	0.69552

Varianzanalyse

	SQ	FG	MQ
Gesamt	1.51694	25.	
Dosen	1.42422	7.	
Substanzen	0.00575	1.	
Regression	1.41632	1.	
Parallelität	0.00042	1.	0.00042
Linearität	0.00174	4.	0.00043
Rest(Fehler)	0.09271	18.	0.00515

F-Wert Parallelität (1., 18.) : 0.08128
F-Wert Linearität (4., 18.) : 0.08429

Dosiswirkungsvergleich
Standard (EPO) Test (Normalplasma, J.G.)

Ausgangswerte Testsubstanz

10.0000	159.0000	133.0000	138.0000	118.0000
20.0000	182.0000	165.0000	178.0000	206.0000
50.0000	282.0000	254.0000	244.0000	

Ausgangswerte Standard

5.0000	131.0000	137.0000	144.0000	
10.0000	212.0000	242.0000	166.0000	178.0000
20.0000	288.0000	240.0000	252.0000	
50.0000	303.0000	367.0000	460.0000	423.0000

Transformierte Werte Testsubstanz

1.0000	2.2014	2.1239	2.1399	2.0719
1.3010	2.2601	2.2175	2.2504	2.3139
1.6990	2.4502	2.4048	2.3874	

Transformierte Werte Standard

0.6990	2.1173	2.1367	2.1584	
1.0000	2.3263	2.3838	2.2201	2.2504
1.3010	2.4594	2.3802	2.4014	
1.6990	2.4814	2.5647	2.6628	2.6263

Titer 0.43188

	Test	Standard	Gesamt
A =	1.73576	1.84383	
B =	0.40052	0.43794	0.42666

Varianzanalyse

	SQ	FG	MQ
Gesamt	0.64114	24.	
Dosen	0.58621	6.	
Substanzen	0.07828	1.	
Regression	0.50554	1.	
Parallelität	0.00082	1.	0.00082
Linearität	0.00157	3.	0.00052
Rest(Fehler)	0.05493	18.	0.00305

F-Wert Parallelität (1., 18.) : 0.26834
F-Wert Linearität (3., 18.) : 0.17179

Dosiswirkungsvergleich
Standard (EPO) Test (Normalplasma, M.S.)

Ausgangswerte Testsubstanz

17.0000	181.0000	237.0000	213.0000	231.0000
33.0000	329.0000	344.0000	349.0000	
67.0000	594.0000	612.0000	601.0000	

Ausgangswerte Standard

12.5000	165.0000	220.0000	205.0000	197.0000
25.0000	402.0000	386.0000	360.0000	
50.0000	613.0000	640.0000	545.0000	

Transformierte Werte Testsubstanz

1.2304	2.2577	2.3747	2.3284	2.3636
1.5185	2.5172	2.5366	2.5428	
1.8261	2.7738	2.7868	2.7789	

Transformierte Werte Standard

1.0969	2.2175	2.3424	2.3118	2.2945
1.3979	2.6042	2.5866	2.5563	
1.6990	2.7875	2.8062	2.7364	

Titer 0.74898

	Test	Standard	Gesamt
A =	1.40197	1.41242	
B =	0.75161	0.81289	0.78262

Varianzanalyse

	SQ	FG	MQ
Gesamt	0.78452	19.	
Dosen	0.76352	5.	
Substanzen	0.00000	1.	
Regression	0.75685	1.	
Parallelität	0.00116	1.	0.00116
Linearität	0.00551	2.	0.00276
Rest(Fehler)	0.02100	14.	0.00150

F-Wert Parallelität (1., 14.) : 0.77353
F-Wert Linearität (2., 14.) : 1.83744

Dosiswirkungsvergleich
Standard (EPO) Test (Normalplasma, gepoolt, I)

Ausgangswerte Testsubstanz

12.5000	217.0000	158.0000	163.0000
25.0000	329.0000	427.0000	397.0000
50.0000	747.0000	853.0000	600.0000

Ausgangswerte Standard

6.2500	174.0000	185.0000	198.0000	160.0000
12.5000	310.0000	289.0000	330.0000	316.0000
25.0000	701.0000	732.0000	704.0000	527.0000

Transformierte Werte Testsubstanz

1.0969	2.3365	2.1987	2.2122
1.3979	2.5172	2.6304	2.5988
1.6990	2.8733	2.9309	2.7782

Transformierte Werte Standard

0.7959	2.2405	2.2672	2.2967	2.2041
1.0969	2.4914	2.4609	2.5185	2.4997
1.3979	2.8457	2.8645	2.8476	2.7218

Titer 0.55278

	Test	Standard	Gesamt
A =	1.14355	1.48700	
B =	1.01611	0.94314	0.97441

Varianzanalyse

	SQ	FG	MQ
Gesamt	1.27180	20.	
Dosen	1.22215	5.	
Substanzen	0.00928	1.	
Regression	1.20457	1.	
Parallelität	0.00165	1.	0.00165
Linearität	0.00665	2.	0.00332
Rest(Fehler)	0.04965	15.	0.00331

F-Wert Parallelität (1., 15.) : 0.49987
F-Wert Linerarität (2., 15.) : 1.00391

Dosiswirkungsvergleich
Standard (EPO) Test (Normalplasma, gepoolt, II)

Ausgangswerte Testsubstanz

12.5000	110.0000	132.0000	155.0000	127.0000
25.0000	257.0000	216.0000	278.0000	
50.0000	553.0000	666.0000	790.0000	

Ausgangswerte Standard

12.5000	252.0000	260.0000	250.0000	245.0000
25.0000	673.0000	510.0000	525.0000	
50.0000	1018.0002	1373.9997	1333.0001	1111.9998

Transformierte Werte Testsubstanz

1.0969	2.0414	2.1206	2.1903	2.1038
1.3979	2.4099	2.3345	2.4440	
1.6990	2.7427	2.8235	2.8976	

Transformierte Werte Standard

1.0969	2.4014	2.4150	2.3979	2.3892
1.3979	2.8280	2.7076	2.7202	
1.6990	3.0077	3.1380	3.1248	3.0461

Titer 0.54900

	Test	Standard	Gesamt
A =	0.81805	1.16819	
B =	1.16446	1.12671	1.14419

Varianzanalyse

	SQ	FG	MQ
Gesamt	2.40836	20.	
Dosen	2.35803	5.	
Substanzen	0.57883	1.	
Regression	1.76767	1.	
Parallelität	0.00048	1.	0.00048
Linearität	0.01106	2.	0.00553
Rest(Fehler)	0.05032	15.	0.00335

F-Wert Parallelität (1., 15.) : 0.14242
F-Wert Linearität (2., 15.) : 1.64873

Dosiswirkungsvergleich
Standard (EPO) Test (Urämisches Plasma, M.Z.)

Ausgangswerte Testsubstanz

25.0000	167.0000	174.0000	182.0000	
50.0000	272.0000	305.0000	332.0000	343.0000
75.0000	518.0000	488.0000	454.0000	412.0000

Ausgangswerte Standard

6.2500	174.0000	185.0000	198.0000	160.0000
12.5000	310.0000	289.0000	330.0000	316.0000
25.0000	701.0000	732.0000	704.0000	527.0000

Transformierte Werte Testsubstanz

1.3979	2.2227	2.2405	2.2601	
1.6990	2.4346	2.4843	2.5211	2.5353
1.8751	2.7143	2.6884	2.6571	2.6149

Transformierte Werte Standard

0.7959	2.2405	2.2672	2.2967	2.2041
1.0969	2.4914	2.4609	2.5185	2.4997
1.3979	2.8457	2.8645	2.8476	2.7218

Titer 0.24004

	Test	Standard	Gesamt
A =	0.98723	1.48700	
B =	0.89312	0.94314	0.92558

Varianzanalyse

	SQ	FG	MQ
Gesamt	1.00168	22.	
Dosen	0.97008	5.	
Substanzen	0.00627	1.	
Regression	0.95716	1.	
Parallelität	0.00064	1.	0.00064
Linearität	0.00601	2.	0.00301
Rest(Fehler)	0.03160	17.	0.00186

F-Wert Parallelität (1., 17.) : 0.34264
F-Wert Linearität (2., 17.) : 1.61741

Dosiswirkungsvergleich
Standard (EPO) Test (Urämisches Plasma, K.G.)

Ausgangswerte Testsubstanz

25.0000	158.0000	182.0000	164.0000	
50.0000	345.0000	267.0000	302.0000	
100.0000	577.0000	508.0000	489.0000	406.0000

Ausgangswerte Standard

12.5000	344.0000	263.0000	204.0000	193.0000
25.0000	460.0000	557.0000	346.0000	513.0000
50.0000	611.0000	625.0000	565.0000	738.0000
100.0000	1132.0001	1304.0000	987.0000	

Transformierte Werte Testsubstanz

1.3979	2.1987	2.2601	2.2148	
1.6990	2.5378	2.4265	2.4800	
2.0000	2.7612	2.7059	2.6893	2.6085

Transformierte Werte Standard

1.0969	2.5366	2.4200	2.3096	2.2856
1.3979	2.6628	2.7459	2.5391	2.7101
1.6990	2.7860	2.7959	2.7520	2.8681
2.0000	3.0538	3.1153	2.9943	

Titer 0.30943

	Test	Standard	Gesamt
A =	1.15371	1.63103	
B =	0.77184	0.70733	0.72550

Varianzanalyse

	SQ	FG	MQ
Gesamt	1.56625	24.	
Dosen	1.46757	6.	
Substanzen	0.28191	1.	
Regression	1.16861	1.	
Parallelität	0.00187	1.	0.00187
Linearität	0.01519	3.	0.00506
Rest(Fehler)	0.09868	18.	0.00548

F-Wert Parallelität (1., 18.) : 0.34096
F-Wert Linearität (3., 18.) : 0.92344

Dosiswirkungsvergleich
Standard (EPO) Test (Urämisches Plasma, D.K.)

Ausgangswerte Testsubstanz

12.5000	115.0000	121.0000	129.0000	
25.0000	215.0000	226.0000	250.0000	
50.0000	382.0000	402.0000	453.0000	461.0000

Ausgangwerte Standard

6.2500	174.0000	185.0000	198.0000	160.0000
12.5000	310.0000	289.0000	330.0000	316.0000
25.0000	701.0000	732.0000	704.0000	527.0000

Transformierte Werte Testsubstanz

1.0969	2.0607	2.0828	2.1106	
1.3979	2.3324	2.3541	2.3979	
1.6990	2.5821	2.6042	2.6561	2.6637

Transformierte Werte Standard

0.7959	2.2405	2.2672	2.2967	2.2041
1.0969	2.4914	2.4609	2.5185	2.4997
1.3979	2.8457	2.8645	2.8476	2.7218

Titer 0.33137

	Test	Standard	Gesamt
A =	1.10042	1.48700	
B =	0.89916	0.94314	0.92278

Varianzanalyse

	SQ	FG	MQ
Gesamt	1.28566	21.	
Dosen	1.25810	5.	
Substanzen	0.10248	1.	
Regression	1.14972	1.	
Parallelität	0.00065	1.	0.00065
Linearität	0.00525	2.	0.00263
Rest(Fehler)	0.02756	16.	0.00172

F-Wert Parallelität (1., 16.) : 0.37652
F-Wert Linearität (2., 16.) : 1.52464

Dosiswirkungsvergleich
Standard (EPO) Test (Urämisches Plasma, T.W.)

Ausgangswerte Testsubstanz

12.5000	130.0000	122.0000	150.0000	
25.0000	159.0000	277.0000	258.0000	166.0000
50.0000	320.0000	285.0000	293.0000	
100.0000	460.0000	526.0000	531.0000	

Ausgangswerte Standard

12.5000	194.0000	197.0000	262.0000	
25.0000	377.0000	366.0000	341.0000	
50.0000	604.0000	643.0000	485.0000	
100.0000	929.0000	843.0000	1024.0000	997.0000

Transformierte Werte Testsubstanz

1.0969	2.1139	2.0864	2.1761	
1.3979	2.2014	2.4425	2.4116	2.2201
1.6990	2.5051	2.4548	2.4669	
2.0000	2.6628	2.7210	2.7251	

Transformierte Werte Standard

1.0969	2.2878	2.2945	2.4183	
1.3979	2.5763	2.5635	2.5328	
1.6990	2.7810	2.8082	2.6857	
2.0000	2.9680	2.9258	3.0103	2.9987

Titer 0.42187

	Test	Standard	Gesamt
A =	1.43564	1.56181	
B =	0.62686	0.70682	0.66913

Varianzanalyse

	SQ	FG	MQ
Gesamt	1.91467	25.	
Dosen	1.83492	7.	
Substanzen	0.51617	1.	
Regression	1.31085	1.	
Parallelität	0.00466	1.	0.00466
Linearität	0.00323	4.	0.00081
Rest(Fehler)	0.07976	18.	0.00443

F-Wert Parallelität (1., 18.) : 1.05268
F=Wert Linearität (4., 18.) : 0.18208

Dosiswirkungsvergleich
Standard (EPO) Test (Urämisches Plasma, U.B.)

Ausgangswerte Testsubstanz

25.0000	192.0000	226.0000	230.0000	
50.0000	276.0000	338.0000	474.0000	
100.0000	500.0000	468.0000	498.0000	520.0000

Ausgangswerte Standard

12.5000	194.0000	197.0000	262.0000	
25.0000	377.0000	366.0000	341.0000	
50.0000	604.0000	643.0000	485.0000	
100.0000	929.0000	843.0000	1024.0000	997.0000

Transformierte Werte Testsubstanz

1.3979	2.2833	2.3541	2.3617	
1.6990	2.4409	2.5289	2.6758	
2.0000	2.6990	2.6702	2.6972	2.7160

Transformierte Werte Standard

1.0969	2.2878	2.2945	2.4183	
1.3979	2.5763	2.5635	2.5328	
1.6990	2.7810	2.8082	2.6857	
2.0000	2.9680	2.9258	3.0103	2.9987

Titer 0.44626

	Test	Standard	Gesamt
A =	1.50987	1.56181	
B =	0.59734	0.70682	0.67532

Varianzanalyse

	SQ	FG	MQ
Gesamt	1.16423	22.	
Dosen	1.10699	6.	
Substanzen	0.10780	1.	
Regression	0.99093	1.	
Parallelität	0.00534	1.	0.00534
Linearität	0.00292	3.	0.00097
Rest(Fehler)	0.05724	16.	0.00358

F-Wert Perallelität (1., 16.) : 1.49228
F-Wert Linearität (3., 16.) : 0.27213

Dosiswirkungsvergleich
Standard (EPO) Test (Urämisches Plasma, L.E.)

Ausgangswerte Testsubstanz

5.0000	107.0000	137.0000	120.0000	117.0000
10.0000	140.0000	178.0000	150.0000	202.0000
20.0000	232.0000	209.0000	209.0000	204.0000
50.0000	316.0000	297.0000	267.0000	325.0000

Ausgangswerte Standard

5.0000	131.0000	137.0000	144.0000	
10.0000	212.0000	242.0000	166.0000	178.0000
20.0000	288.0000	240.0000	252.0000	
50.0000	303.0000	367.0000	460.0000	423.0000

Transformierte Werte Testsubstanz

0.6990	2.0294	2.1367	2.0792	2.0682
1.0000	2.1461	2.2504	2.1761	2.3054
1.3010	2.3655	2.3201	2.3201	2.3096
1.6990	2.4997	2.4728	2.4265	2.5119

Transformierte Werte Standard

0.6990	2.1173	2.1367	2.1584	
1.0000	2.3263	2.3838	2.2201	2.2504
1.3010	2.4594	2.3802	2.4014	
1.6990	2.4814	2.5647	2.6628	2.6263

Titer 0.63192

	Test	Standard	Gesamt
A =	1.81204	1.84383	
B =	0.39503	0.43794	0.41518

Varianzanalyse

	SQ	FG	MQ
Gesamt	0.84860	29.	
Dosen	0.78148	7.	
Substanzen	0.06480	1.	
Regression	0.71196	1.	
Parallelität	0.00189	1.	0.00189
Linearität	0.00282	4.	0.00071
Rest(Fehler)	0.06712	22.	0.00305

F-Wert Parallelität (1., 22.) : 0.62088
F-Wert Linearität (4., 22.) : 0.23108

Dosiswirkungsvergleich
Standard (EPO) Test (Urämisches Plasma, S.H.)

Ausgangswerte Testsubstanz

12.5000	130.0000	113.0000	121.0000	
25.0000	178.0000	200.0000	182.0000	172.0000
50.0000	266.0000	281.0000	367.0000	
100.0000	549.0000	504.0000	425.0000	

Ausgangswerte Standard

12.5000	344.0000	263.0000	204.0000	193.0000
25.0000	460.0000	557.0000	346.0000	513.0000
50.0000	611.0000	625.0000	565.0000	738.0000
100.0000	1132.0001	1304.0000	987.0000	

Transformierte Werte Testsubstanz

1.0969	2.1139	2.0531	2.0828	
1.3979	2.2504	2.3010	2.2601	2.2355
1.6990	2.4249	2.4487	2.5647	
2.0000	2.7396	2.7024	2.6284	

Transformierte Werte Standard

1.0969	2.5366	2.4200	2.3096	2.2856
1.3979	2.6628	2.7459	2.5391	2.7101
1.6990	2.7860	2.7959	2.7520	2.8681
2.0000	3.0538	3.1153	2.9943	

Titer 0.63244

	Test	Standard	Gesamt
A =	0.44882	1.63103	
B =	1.34997	0.70733	1.00546

Varianzanalyse

	SQ	FG	MQ
Gesamt	6.80536	27.	
Dosen	3.98711	7.	
Substanzen	0.22932	1.	
Regression	3.00772	1.	
Parallelität	0.30558	1.	0.30558
Linearität	0.44449	4.	0.11112
Rest(Fehler)	2.81825	20.	0.14091

F-Wert Parallelität (1., 20.) : 2.16854
F-Wert Linearität (4., 20.) : 0.78859

Dosiswirkungsvergleich
Standard (EPO) Test (Urämisches Plasma, A.K.)

Ausgangswerte Testsubstanz

12.5000	268.0000	251.0000	186.0000	
25.0000	387.0000	361.0000	305.0000	331.0000
50.0000	604.0000	410.0000	477.0000	
100.0000	1090.9998	830.0000	681.0000	
200.0000	1351.0001	1383.0000	1457.9999	1273.0002

Ausgangswerte Standard

12.5000	344.0000	263.0000	204.0000	193.0000
25.0000	460.0000	557.0000	346.0000	513.0000
50.0000	611.0000	625.0000	565.0000	738.0000
100.0000	1132.0001	1304.0000	987.0000	

Transformierte Werte Testsubstanz

1.0969	2.4281	2.3997	2.2695	
1.3979	2.5877	2.5575	2.4843	2.5198
1.6990	2.7810	2.6128	2.6785	
2.0000	3.0378	2.9191	2.8331	
2.3010	3.1307	3.1408	3.1638	3.1048

Transformierte Werte Standard

1.0969	2.5366	2.4200	2.3096	2.2856
1.3979	2.6628	2.7459	2.5391	2.7101
1.6990	2.7860	2.7959	2.7520	2.8681
2.0000	3.0538	3.1153	2.9943	

Titer 0.72503

	Test	Standard	Gesamt
A =	1.63711	1.63103	
B =	0.64482	0.70733	0.66576

Varianzanalyse

	SQ	FG	MQ
Gesamt	2.28449	31.	
Dosen	2.14835	8.	
Substanzen	0.01216	1.	
Regression	2.11039	1.	
Parallelität	0.00414	1.	0.00414
Linearität	0.02165	5.	0.00433
Rest(Fehler)	0.13614	23.	0.00592

F-Wert Parallelität (1., 23.) : 0.69990
F-Wert Linearität (5., 23.) : 0.73164

Dosiswirkungsvergleich
Standard (EPO) Test (Aplastische Anämie)

Ausgangswerte Testsubstanz

6.2500	157.0000	191.0000	219.0000	146.0000
25.0000	926.0000	916.0000	1000.0002	
50.0000	2174.9997	2619.0001	2929.9998	
100.0000	5475.9997	5242.9998	5439.0001	

Ausgangswerte Standard

12.5000	252.0000	260.0000	250.0000	245.0000
25.0000	673.0000	510.0000	525.0000	
50.0000	1018.0002	1373.9997	1333.0001	1111.9998

Transformierte Werte Testsubstanz

0.7959	2.1959	2.2810	2.3404	2.1644
1.3979	2.9666	2.9619	3.0000	
1.6990	3.3375	3.4181	3.4669	
2.0000	3.7385	3.7196	3.7355	

Transformierte Werte Standard

1.0969	2.4014	2.4150	2.3979	2.3892
1.3979	2.8280	2.7076	2.7202	
1.6990	3.0077	3.1380	3.1248	3.0461

Titer 1.61143

	Test	Standard	Gesamt
A =	1.25097	1.16819	
B =	1.24842	1.12671	1.22340

Varianzanalyse

	SQ	FG	MQ
Gesamt	5.81708	23.	
Dosen	5.76738	6.	
Substanzen	0.47328	1.	
Regression	5.27923	1.	
Parallelität	0.00854	1.	0.00854
Linearität	0.00633	3.	0.00211
Rest(Fehler)	0.04970	17.	0.00292

F-Wert Parallelität (1., 17.) : 2.91967
F-Wert Linearität (3., 17.) : 0.72171

Dosiswirkungsvergleich
Standard (EPO) Test (Polyzythämia vera)

Ausgangswerte Testsubstanz

25.0000	122.0000	126.0000	143.0000
50.0000	175.0000	250.0000	201.0000
75.0000	367.0000	268.0000	322.0000

Ausgangswerte Standard

6.2500	174.0000	185.0000	198.0000	160.0000
12.5000	310.0000	289.0000	330.0000	316.0000
25.0000	701.0000	732.0000	704.0000	527.0000

Transformierte Werte Testsubstanz

1.3979	2.0864	2.1004	2.1553
1.6990	2.2430	2.3979	2.3032
1.8751	2.5647	2.4281	2.5079

Transformierte Werte Standard

0.7959	2.2405	2.2672	2.2967	2.2041
1.0969	2.4914	2.4609	2.5185	2.4997
1.3979	2.8457	2.8645	2.8476	2.7218

Titer 0.15950

	Test	Standard	Gesamt
A =	0.99342	1.48700	
B =	0.79419	0.94314	0.89471

Varianzanalyse

	SQ	FG	MQ
Gesamt	1.14844	20.	
Dosen	1.10480	5.	
Substanzen	0.23090	1.	
Regression	0.85993	1.	
Parallelität	0.00523	1.	0.00523
Linearität	0.00875	2.	0.00437
Rest(Fehler)	0.04364	15.	0.00291

F-Wert Parallelität (1., 15.) : 1.79752
F-Wert Linearität (2., 15.) : 1.50317

9. Thesen

1. Die renale Anämie ist eines der Hauptsymptome bei chronischer Niereninsuffizienz.

2. Die renale Anämie und ihre Komplikationen (z.B. Hepatitis, Hämosiderose, Sensibilisierung) bestimmen in starkem Maße die Lebensqualität und die Transplantationsbereitschaft der Hämodialysekinder.

3. Die Pathogenese der renalen Anämie ist ein multifaktorielles Geschehen. Als Ursachen werden diskutiert:

   - Blutverluste (durch Schleimhautblutungen bei Thrombozytenfunktionsstörung und Heparinisierung, durch den extrakorporalen Kreislauf bei Dialyse, durch regelmäßige diagnostische Blutentnahmen)
   - verstärkte Hämolyse im urämischen Milieu
   - Mangel an Erythropoietin bzw. weiteren die Erythropoese stimulierenden Faktoren
   - Erythropoese-hemmende Faktoren (sogenannte „Urämietoxine").

4. Die fötale Mäuseleberzellkultur ist ein geeignetes Testsystem zum Nachweis stimulierender und hemmender Faktoren der Erythropoese.

5. Fötale Mäuseleberzellen stellen vom 12. bis 14. Gestationstag fast ausschließlich erythroide Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien dar, also überwiegend Erythropoietin-sensible Zellen, deren Proliferation von der Konzentration des Erythropoietins im Kulturmedium abhängt.
   In einem einfachen Kultursystem (Mc Coy's 5A-Medium, 10 % fötales Kälberserum, 24 h, 37° C, 5 % CO_2-Luftgemisch) kann die Wirkung des Erythropoietins an der Steigerung des ^3H-Thymidin-Einbaus in die DNS der fötalen Mäuseleberzellen gemessen werden.

6. Im Gegensatz zu Testsystemen, die auf dem ^{59}Fe-Einbau beruhen, wird bei der Bestimmung der Erythropoietin-Wirkung anhand des ^{3}H-Thymidin-Einbaus die Zellproliferation - und nicht die Hämsynthese - gemessen, und es werden zusätzlich die erythroiden Vorläuferzellen erfaßt, in denen noch keine Hämsynthese stattfindet.

7. Der ^{3}H-Thymidin-Einbau bietet gegenüber dem ^{59}Fe-Einbau bei der Erfassung der Erythropoietin-Wirkung folgende Vorteile:

   - aufwendige Strahlenschutzmaßnahmen sind überflüssig
   - keine Verfälschung der Ergebnisse durch Verdünnung des radioaktiv markierten Eisens durch den Eisengehalt im Plasma
   - günstigeres Verhältnis der Meßwerte zwischen stimulierter und Kontrollkultur.

8. Die Empfindlichkeit der Methode ist abhängig von der Zellkonzentration in der Kultur. Die Verwendung von 5×10^5 Zellen pro Kultur (1,2 ml) erwies sich als optimal und erlaubte den sicheren Nachweis von 0,005 Einheiten Erythropoietin.

9. Der Variabilitätskoeffizient der pro Meßpunkt durchgeführten vier Parallelbestimmungen lag im Durchschnitt deutlich unter 10 % und belegt die gute Reproduzierbarkeit der Methode.

10. Die Abhängigkeit des ^{3}H-Thymidin-Einbaus von der Erythropoietin-Konzentration ist durch Dosis-Wirkungs-Kurven darstellbar, die bei logarithmischer Transformation im Bereich zwischen 0,006 und 0,100 Einheiten Erythropoietin pro Kultur linear verliefen.

11. Die interexperimentelle Variabilität, die sich in der unterschiedlichen Lage der Erythropoietin-Dosis-Wirkungs-Kurven verschiedener Versuche ausdrückt, ist vor allem auf das unterschiedliche Alter (11 - 13 d) der verwendeten fötalen Mäuseleberzellen zurückzuführen, woraus Unterschiede sowohl im Anteil der Erythropoietin-sensiblen Zellen (quantitativ) als auch im Empfindlichkeitsgrad der Zellen gegenüber Erythropoietin (qualitativ) resultieren.

12. Die Vorteile der fötalen Mäuseleberzellkultur gegenüber anderen biologischen Methoden (Polyzythämischer Mäuse-Assay, Knochenmarkkultur) liegen in hoher Empfindlichkeit, guter Reproduzierbarkeit und exakter statistischer Auswertbarkeit.

13. Für die Bestimmung unbekannter Erythropoietinkonzentrationen in menschlichen Plasmen sind Linearität und Parallelität der Dosis-Wirkungs-Kurven von Standard (Erythropoietin) und Testmaterial (Plasma) Voraussetzung. Dies war bei allen untersuchten Plasmen der Fall; daher konnten quantitative Aussagen über die Erythropoese-stimulierende Aktivität (ESA) der Plasmen im Vergleich zum Erythropoietin-Standard gemacht werden.

14. Das Hormon Erythropoietin fungiert als Hauptregulator der Erythropoese. Seine Wirkung wird durch weitere Plasmafaktoren modifiziert. Bei Testung von Plasmen in vitro kann der Einfluß derartiger Faktoren auf die Proliferation erythroider Zellen nicht von der eigentlichen Erythropoietin-Wirkung unterschieden werden. Die Gesamtaktivität eines Plasmas wird daher nicht in Erythropoietin-Einheiten sondern in ESA (Erythropoese-stimulierende Aktivität)-Einheiten angegeben.

15. Die Erythropoese-stimulierenden Aktivitäten (ESA) in den Plasmen von Hämodialysekindern waren individuell verschieden:
Drei binephrektomierte Patienten hatten im Vergleich mit dem für Normalplasma bestimmten Wert (0,55 E/ml) deutlich erniedrigte ESA-Werte (0,24 - 0,33 E/ml). Für andere Hämodialysekinder wurden ESA-Spiegel in der Größenordnung der Normalplasmen (0,42 - 0,72 E/ml) bestimmt, die jedoch weit unter den Werten lagen, die für anämische nierengesunde Patienten typisch sind (z.B. aplastische Anämie: 1,61 E/ml). Alle Hämodialysekinder hatten also einen absoluten bzw. relativen ESA-Mangel.

16. Zwischen den bestimmten ESA-Gehalten im Plasma terminal niereninsuffizienter Kinder und ihren Hämatokrit-Werten wurde eine positive Korrelation festgestellt. Dies unterstreicht die Bedeutung des ESA- bzw. EPO-Mangels für die Pathogenese der renalen Anämie.

17. Bei Anwendung der fötalen Mäuseleberzellkultur als Testsystem für Hemmstoffe der Proliferation erythroider Zellen bewirkten alle untersuchten urämischen Plasmen im Vergleich zu Normalplasmen signifikant niedrigere ^{3}H-Thymidin-Einbauraten. Nach Abtrennung des Erythropoietins und anderer höhermolekularer Substanzen durch Ultrafiltration (Ausschlußgrenze 20 000 Dalton) war dieser Hemmeffekt des urämischen Plasmas noch deutlicher nachweisbar.

18. Durch Vergleich der Wirkung urämischer Plasmen unmittelbar vor und nach Hämodialyse ließ sich zeigen, daß die Inhibitoren durch die Dialysebehandlung nicht wirksam entfernt wurden.

19. Ziel weiterer Untersuchungen sollte es sein, urämische Plasmen zu fraktionieren und die einzelnen Fraktionen im Hinblick auf ihre Erythropoese hemmende Wirkung zu überprüfen.
Die Charakterisierung der Inhibitoren könnte wirksamere Dialyseregime ermöglichen.

E r k l ä r u n g

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die vorliegende Arbeit ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt und keine unerlaubte Hilfe in Anspruch genommen wurde.

Berlin, im April 1985

Christine Groulx